

UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

Mémoire de Master 2

**Utilisation de marqueurs moléculaires pour une avancée dans la
résolution de la phylogénie du genre *Vanilla***

Mathieu Duvignau



Sous l'encadrement de :

Michel GRISONI, CIRAD, UMR PVBMT

Rodolphe GIGANT, Université de La Réunion, UMR PVBMT

1^{er} mars au 4 septembre 2012

UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT) Pôle de
Protection des Plantes-7chemin de l'IRAT-97410 St Pierre, la Réunion

UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

Mémoire de Master 2

**Utilisation de marqueurs moléculaires pour une avancée dans la
résolution de la phylogénie du genre *Vanilla***

Mathieu Duvignau

Sous l'encadrement de :

Michel GRISONI, CIRAD, UMR PVBMT

Rodolphe GIGANT, Université de La Réunion, UMR PVBMT

1^{er} mars au 4 septembre 2012

UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT) Pôle de
Protection des Plantes-7chemin de l'IRAT-97410 St Pierre, la Réunion

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants, Michel Grisoni et Rodolphe Gigant pour toute la patience et la gentillesse qu'ils ont eu envers un stagiaire qui savait tout juste se servir d'une pipette en arrivant ! De toutes les étapes de manip' en labo jusqu'à l'analyse des résultats et la rédaction du rapport : MERCI !

Je tiens également à remercier Isabelle Fock Bastide ainsi que Pascale Besse pour leur aide précieuse pour le développement de marqueurs sur les gènes candidats !

Mes remerciements vont également à Katia Jade, Jean-bernard Dijoux et Gérald, Lulu, Murielle Hoareau, Anais Brugel pour leur aide en labo ou sur le terrain ainsi que leur constante bonne humeur !

Je tiens également à remercier la fine équipe des stagiaires, VCS, thésards qui ont rendu ce stage d'autant plus agréable !

Et enfin, un grand merci à Marion pour son extrême patience, son aide précieuse et son soutien inconditionnel !

Tables des matières

Introduction

Pourquoi faire une classification du genre <i>Vanilla</i> ?	1
Description botanique du genre <i>Vanilla</i>	2
Systématique du genre <i>Vanilla</i>	3
Diversité du genre <i>Vanilla</i>	3
Phylogéographie du genre <i>Vanilla</i>	4
Un outil d'identification d'espèces : « le barcoding »	5

Matériel et méthodes

Matériel biologique	6
Extraction et préparation des ADN	6
Choix des marqueurs, et selection/conception des amorces	6
Amplification des fragments cibles par Polymerase Chain Reaction (PCR)	7
Clonage	8
Séquençage	9
Traitement des séquences	9
Construction des arbres phylogénétiques	9
Mesure des traits floraux	10
Analyse statistique des traits floraux	10

Résultats

Recherche de marqueurs introniques dans deux gènes du métabolisme des phenyl-propanoïdes	11
Analyse phylogénétique	
Séquences chloroplastiques codantes (<i>psaB</i> , <i>psbC</i> et <i>matK</i>)	13
Séquences de la région ITS	14
Séquence partielle du gène PAL	15
Comparaisons morphologiques des accessions du groupe <i>V.africana</i>	16

Discussion	17
-------------------------	----

Conclusion	20
-------------------------	----

Bibliographie	
----------------------------	--

Résumé	
---------------------	--

Annexes	
----------------------	--

Introduction

Pourquoi faire une classification du genre *Vanilla* ?

Le vanillier (genre *Vanilla* Plumier ex Miller, Orchidaceae) est une espèce d'intérêt agronomique majeur. La vanille représente la deuxième épice la plus chère sur le marché mondial après le safran, et est principalement cultivée dans les régions déshéritées du globe selon un système agroforestier respectueux de l'environnement. Deux espèces cultivées, *Vanilla planifolia* (G. Jackson) et *Vanilla tahitensis* (J.W. Moore) représentent respectivement 95% et 5% du marché mondial. Ceci génère une activité économique importante dans certains pays, comme c'est principalement le cas à Madagascar, aux Comores, en Ouganda, en Indonésie ou en Inde (Loeillet, 2003).

Le genre *Vanilla* comporte une centaine d'espèces dont le potentiel agronomique est surement sous exploité. L'histoire du développement de la culture de la vanille fait que l'ensemble des plantations de *V. planifolia* sont reproduites à partir d'un même clone. La diversité génétique chez les vanilliers cultivés est donc très faible (Bory *et al.*, 2008), ce qui lui confère un statut très vulnérable en cas d'attaques phytopathogènes ou parasites comme c'est le cas avec le champignon pathogène *Fusarium* ou le *Cymbidium* mosaic virus (CymMV, Potexvirus).

Une trentaine d'espèces de vanilliers sont dotées de gousses aromatiques, et l'on connaît de plus, des propriétés conférant des caractères de résistance (sécheresse, maladie) chez d'autres espèces apparentées au vanillier cultivé. Cependant, les ressources des pools génétiques primaires et secondaires de *V. planifolia* sont restreintes et menacées en raison de la déforestation et de collectes trop importantes dans l'aire d'origine. Ils constituent une source de caractères agronomiques intéressants pour générer des hybrides aptes à l'autopollinisation, résistants à la sécheresse et aux maladies, moins dépendant de la photopériode pour la floraison, pouvant produire des gousses plus grosses, indéhiscentes et avec un meilleur profil aromatique (Soto Arenas, 1999 ; Minoo *et al.*, 2006). Le meilleur moyen de préserver ces ressources naturelles serait une conservation *in situ* dans leurs habitats naturels. Malheureusement, ces zones étant souvent sous haute pression anthropique, cette stratégie ne serait viable que dans le cadre d'un projet de conservation globale de ces territoires (Soto Arenas, 1999). La collecte, la conservation *ex situ* et l'évaluation des ressources génétiques dans le centre d'origine et dans les zones de dispersion secondaire sont donc des priorités (Duval *et al.*, 2006). C'est dans cette logique que fut initié en 2003, au CIRAD de La Réunion, une collection de ressources génétiques des vanilliers (CRB VATEL) comprenant aujourd'hui plus de 800 accessions incluant environ 250 plants maintenus sous ombrières et/ou en culture *in vitro* (Bory *et al.*, 2007). Cette collection contient des accessions d'espèces cultivées ainsi qu'une trentaine environ d'espèces apparentées (Grisoni *et al.*, 2007).

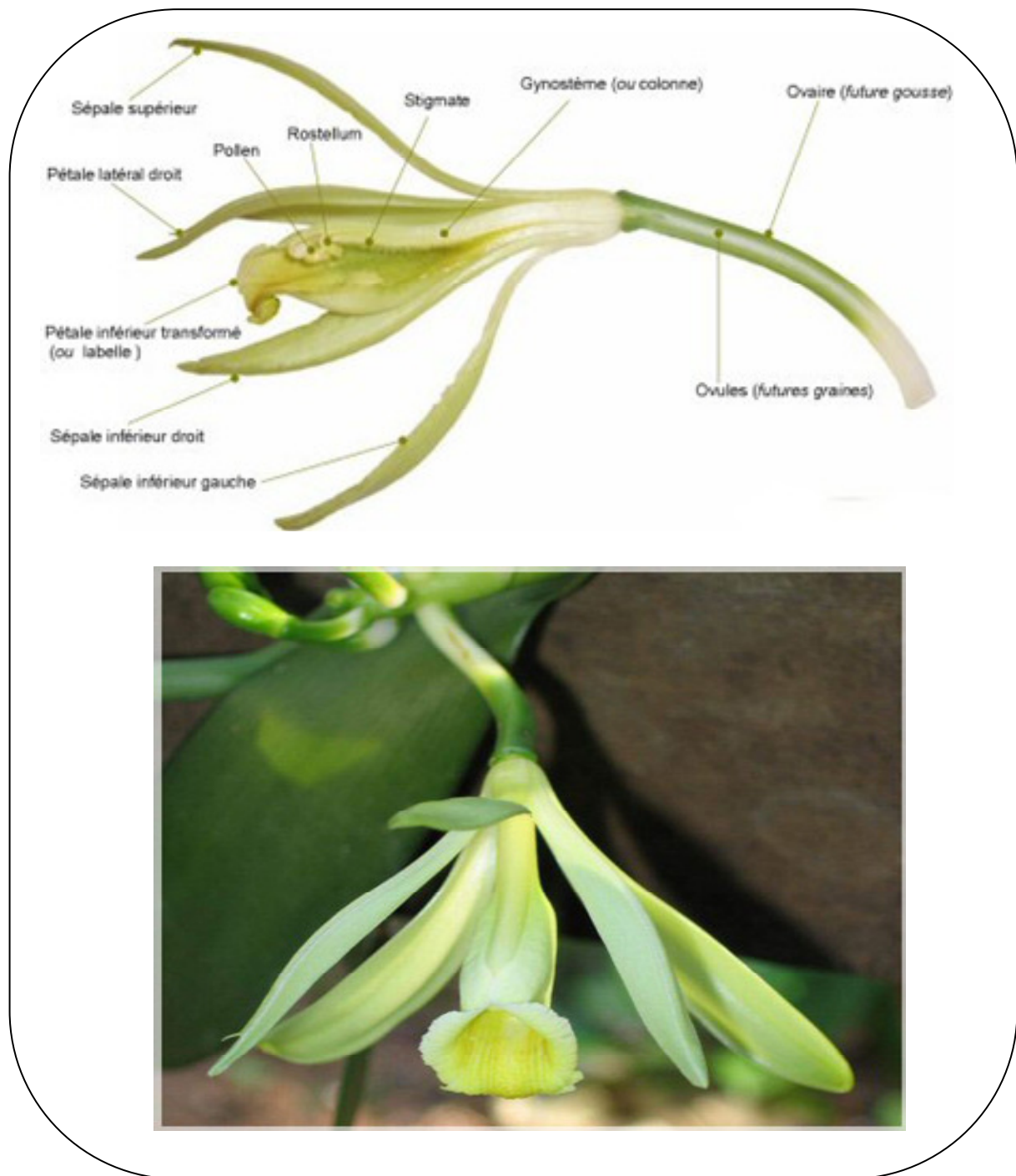


Figure 1 : Détails des différentes parties florales d'une fleur de *Vanilla planifolia*

De nombreuses accessions provenant de collaborations scientifiques, d'échanges avec des jardins botaniques ou de particuliers, ou encore de diverses prospections ne sont pas encore identifiées avec certitude. En effet, les caractères végétatifs sont difficilement utilisables pour l'identification des espèces (Portères, 1954), et seule l'observation des caractères floraux permet cette identification au fur et à mesure de la floraison des spécimens de la collection. Dans cette attente, et de façon complémentaire, cette identification doit pouvoir être faite en utilisant les outils de biologie moléculaire.

Depuis quelques décennies en effet, le développement croissant des outils de biologie moléculaire a permis de résoudre de nombreuses phylogénies chez les plantes. En ce qui concerne les espèces du genre *Vanilla*, ce type de travail a été initié il y a une dizaine d'années d'abord principalement axé sur l'emploi de marqueur chloroplastiques et pour un nombre réduit de taxons. Cependant, de nombreuses espèces n'ont pas encore été incluses à ces travaux, et les relations entre certaines espèces demeurent mal résolues. Le genre *Vanilla* apparaît d'autre part comme un groupe taxonomique complexe au sein duquel ont été mis en évidence de événements d'hybridation interspécifiques naturels (Nielsen, 1999 ; Lubinsky *et al.*, 2008), ou de polyploïdisation (Bory 2008, Leepers 2011), qui rendent l'histoire évolutive du genre particulièrement confuse (Gigant *et al.*, 2011).

Description botanique du genre *Vanilla*

Le vanillier est une orchidée semi-épiphyte terrestre pérenne. Il présente une tige lianescente, avec des crampons qui lui permettent de se fixer à un support. Les feuilles alternes, sont coriaces ou charnues de longueur variant entre 15 et 25 cm. Certaines espèces du genre *Vanilla* sont aphyllées (c'est-à-dire sans feuilles, ou possédant des feuilles réduites à l'état de bractées). Ces espèces aphyllées présentent une plus grande résistance à la sécheresse et à l'ensoleillement que les autres espèces de vanilliers qui croissent dans des forêts ombrophiles. En culture, la première floraison intervient généralement lors de la troisième année et permet la production d'une centaine de gousses par pied. Les fleurs s'ouvrent dans la matinée pour se refermer en fin de journée, qu'il y ait eu ou non pollinisation. Les fleurs de vanilliers sont typiques des orchidées : elles se composent de 3 sépales alternant avec 3 pétales (Figure 1). Deux des pétales sont identiques et le troisième pétale forme le labelle. Le labelle enveloppe les organes reproducteurs composés de l'androcée et du style qui se soudent en une pièce appelée « colonne » ou gynostème (Bouriquet, 1954). Le pollen s'agglomère en pollinies. L'ovaire est infère, peu distinct du pédoncule de la fleur. Les fleurs sont hermaphrodites : les organes reproducteurs mâle et femelle sont séparés par le rostellum qui est une fine membrane s'élevant du bord supérieur du stigmate (Soto Arenas, 2003). A l'exception de quelques espèces

autofertiles, on suppose que la majorité des vanilliers se reproduisent naturellement par pollinisation entomophile. En Amérique tropicale, les pollinisateurs semblent être des abeilles des genres *Xylocopa* et *Euglossa* qui permettraient la fécondation des fleurs, nécessaire à la formation des gousses (Soto Arenas, 1999 ; Lubinsky *et al.*, 2006 ; Bory *et al.*, 2007, Householder *et al.*, 2010). Cependant, même dans la zone d'origine, un faible pourcentage de fleurs est fécondé naturellement (Bory *et al.*, 2007). En Afrique, Gigant *et al.* (2012) ont récemment proposé un syndrome de pollinisation analogue mettant en jeu des abeille *Allodapes*. La pollinisation manuelle, découverte à La Réunion par Edmond Albius en 1841, permet une fructification abondante et régulière. Ce procédé consiste à relever et à placer le rostellum sous les étamines pour permettre un contact entre le stigmate et le pollen. Les capsules arrivent à maturité huit à neuf mois après pollinisation et renferment plusieurs milliers de graines (Bouriquet, 1954).

Position systématique du genre *Vanilla*

La famille des Orchidaceae dont fait partie le genre *Vanilla* compte 800 genres et plus de 25 000 espèces recensées (Govaerts *et al.*, 2006). La systématique des Orchidaceae est une tâche compliquée du fait du nombre important d'espèces ainsi que de la grande variabilité morphologique des fleurs. En effet, la pression sélective qu'exercent les insectes pollinisateurs entraîne une forte variabilité morpho-anatomique (Cameron *et al.*, 1999 ; Micheneau, 2002). De ce postulat, de nombreuses classifications ont été proposées. Néanmoins, la classification de Dressler (1993) qui est basée sur la position et le nombre d'étamines est généralement utilisée comme référence (Cameron, 1999).

L'émergence et le développement de la biologie moléculaire et de la phylogénétique a bouleversé et permis une autre approche de la classification du règne végétal, notamment pour la famille complexe des Orchidaceae.

En 1999, Cameron propose une phylogénie de la famille des Orchidaceae basée sur le séquençage du gène chloroplastique *rbcL*. Il propose ainsi une division de la famille en cinq groupes monophylétiques majeurs : les Apostasioideae, les Cypripedioideae, les Orchidoideae, les Epidendroideae et les Vanilloideae. Cette classification reste proche de la classification de Dressler (1993) mis à part pour le groupe des Vanilloideae qui forme désormais une nouvelle sous-famille à part entière (Cameron *et al.*, 1999).

D'autres séquences chloroplastiques dont les gènes *psaB*, *psbB* et *psbC* ont été analysées pour compléter les relations phylogénétiques chez les Orchidaceae (Cameron, 2004 ; Cameron & Molina, 2006). Ces différentes études ont permis de placer le genre *Vanilla* dans la sous-famille des Vanilloideae, la tribu des Vanilleae, et la sous-tribu des Vanillinae (Cameron, 2005).

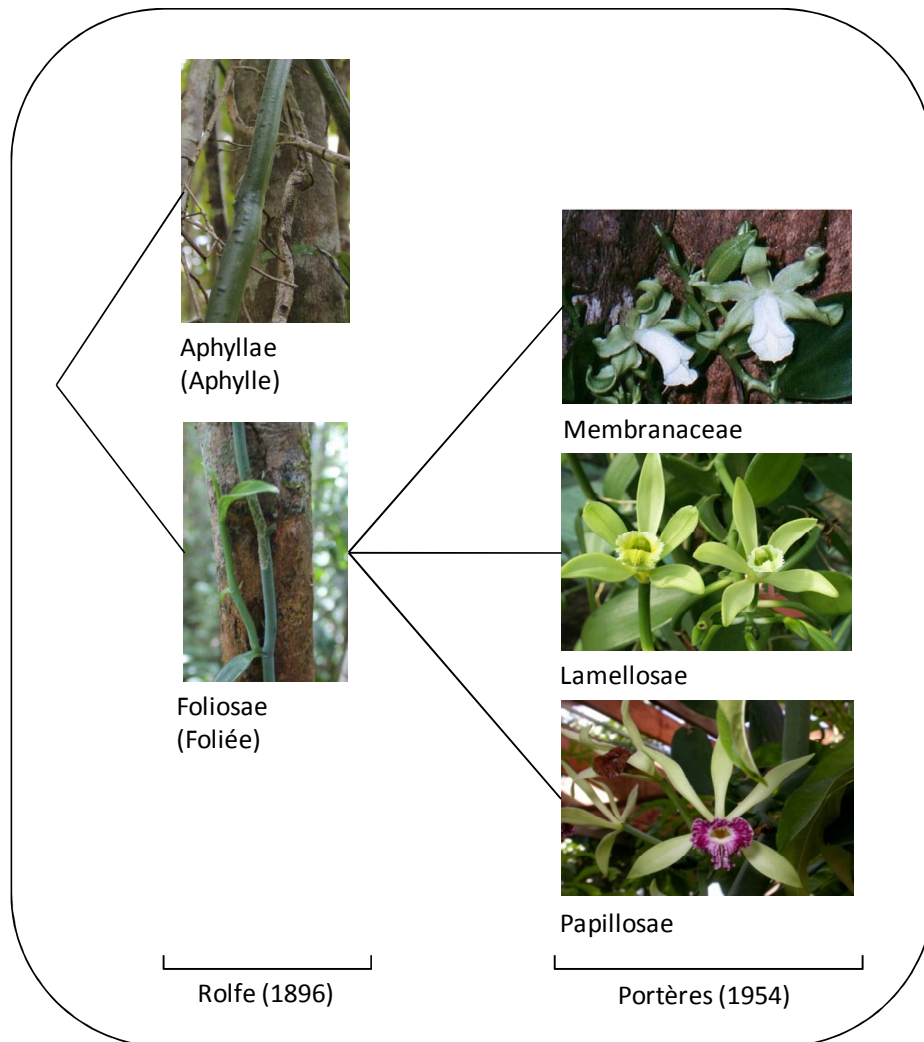


Figure 2. Principaux groupes taxonomiques du genre *Vanilla* selon les classifications de Rolfe (1896) et Portères (1954).

Taxonomie du genre *Vanilla*

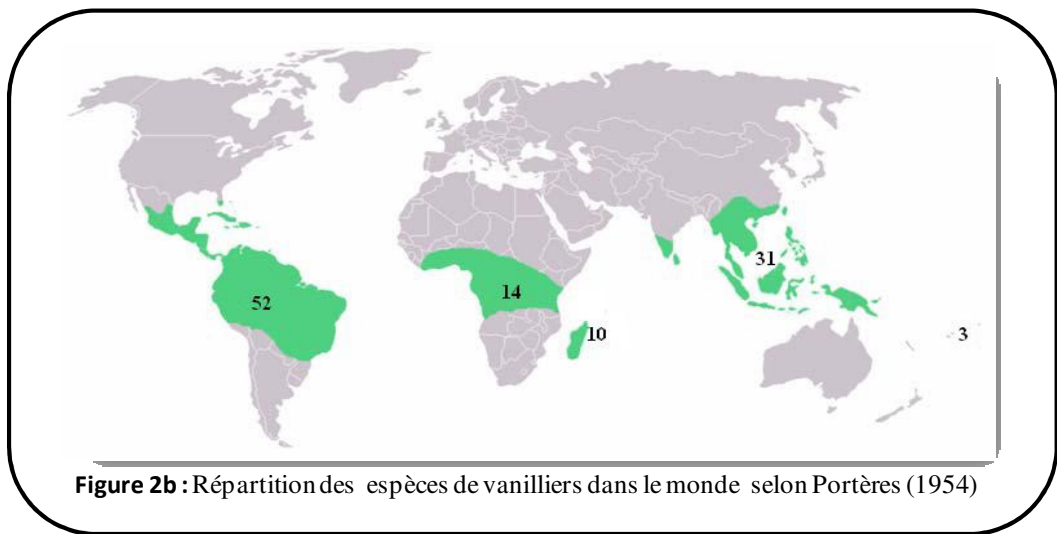
Le nombre total d'espèces du genre *Vanilla* varie selon les auteurs, entre 90 (Cameron & Chase, 1999) et 110 (Portères, 1954). Rolfe, en 1896, fut le premier à proposer une classification du genre *Vanilla*. Sa classification repose uniquement sur la présence ou l'absence de feuilles. Il propose ainsi une classification des vanilliers en deux sections : les Foliosae étant les vanilliers dotés de feuilles et les Aphyllae qui en sont dépourvus (Portères, 1954). Portères, en 1954, proposa ensuite d'affiner cette classification en divisant la section des Foliosae en trois sous-sections basées sur l'épaisseur des feuilles et les caractéristiques du labelle (Figure 2). Parmi ces sous-sections, on trouve le groupe des Lamellosae avec des feuilles épaisses et un labelle à lamelles écailleuses, les Papillosae avec des feuilles épaisses et un labelle à poils plus ou moins charnus et le groupe des Membranaceae avec des feuilles peu épaisses, membraneuses, avec un labelle à carène, à tube très allongé, fin et élancé. Ces sous-sections furent jugées hétérogènes et incomplètes par Soto Arenas (2003) qui invalida cette classification intra-générique. La classification la plus récente du genre *Vanilla* a été obtenue à l'aide de 4 marqueurs moléculaires chloroplastiques (*psaB*, *psbB*, *psbC* et *rbcL*) par Soto Arenas (2003), Cameron (2005), Bouetard *et al.*, 2010, et met en évidence une origine américaine du genre.

Phylogéographie du genre *Vanilla*

Selon Portères (1954), toutes les espèces du genre *Vanilla* se répartissent entre les 27^{ème} parallèles Nord et Sud. On en trouve une majorité en Amérique (52 espèces), viennent ensuite l'Asie (31 espèces), l'Afrique (17 espèces), les îles de l'Océan Indien (7 espèces) puis les îles de l'Océan Pacifique (3 espèces) (Figure 2b). Pour cet auteur, en se basant uniquement sur les caractères floraux, le centre de dispersion du genre serait Indo-Malais. Selon son hypothèse, il y aurait eu deux épisodes de dispersion. Le premier aurait eu lieu vers l'Afrique, Madagascar et les îles de l'Océan Indien. Le second épisode de dispersion aurait eu lieu vers l'Asie orientale, les îles du Pacifique puis enfin l'Amérique. Cette première hypothèse a depuis été invalidée par différentes études de phylogénie moléculaire (Cameron, 2000 ; Bouetard *et al.*, 2010). L'hypothèse la plus récente (et la plus probable) serait alors qu'une espèce d'origine Sud-Américaine du genre soit apparu il y a 34.6 Ma, bien après la scission du Gondwana. La dernière hypothèse en date concerne la diversification du genre *Vanilla* qui serait la résultante de trois événements de migration trans-océanique (Bouetard *et al.*, 2010).

Un outil d'identification d'espèces : le « Barcoding »

Le principe du « barcoding » est d'utiliser une courte séquence d'ADN qui puisse permettre une identification taxonomique d'un spécimen à l'échelle spécifique. Cet outil est déjà bien développé pour identifier les différents taxons du Règne Animal. En effet, le gène mitochondrial codant pour la cytochrome c oxydase (COI) fait déjà référence de « code-barre »



standard pour quasiment tous les groupes d' « animaux supérieurs ». Seulement ce gène COI ne présente pas assez de variations à l'échelle intra-spécifique chez les différentes familles de plantes pour en faire un bon marqueur (Kress *et al.*, 2005). Depuis maintenant une dizaine d'années, le marqueur qui permettrait de différencier les espèces de plantes aussi efficacement que le gène COI chez les animaux est devenu le « Graal » de bon nombre de scientifiques (Rubinoff *et al.*, 2006). Les caractéristiques du code barre idéal doivent être (1) une séquence relativement courte, (2) d'être amplifiable à partir d'ADN dégradé (ADN d'herbier par exemple), (3) être plus variable entre les espèces sœurs qu'au sein des espèces et (4) être facilement amplifiable avec des amorces universelles. A ce jour, plusieurs marqueurs issus du génome chloroplastique (donc partageant avec le génome mitochondrial une hérédité maternelle) font office de candidats de choix pour le barcoding végétal: *rbcL*, *matK*, *psaB*, *psbB*, *psbC*, *rpoB* (Hollingsworth *et al.*, 2009). En plus des marqueurs chloroplastiques codants, sont aussi utilisés des marqueurs non codants chloroplastiques telles que les intergènes *trnH-psbA* (Cowan *et al.*, 2006), ou *trnD-trnT* (Demesure *et al.*, 1995), ou nucléaires tel que les espaceurs intergéniques des régions codantes de l'ADN ribosomique, (ITS) (Baldwin *et al.*, 1995).

Dès les premières études, les différents auteurs s'accordent à dire que le code barre idéal chez les végétaux devra être *multilocus* (Kress *et al.*, 2005). Newmaster *et al.*, (2006) proposent une séquence fondamentale : une région du génome chloroplastique codant pour la sous unité de la Rubisco (*rbcL*). Chez le genre *Vanilla*, on dispose à ce jour dans les banques de données des séquences pour les marqueurs suivants *psaB*, *psbB*, *psbC*, *rbcL* et ITS.

Objectifs du stage:

Depuis une dizaine d'années une meilleure connaissance de la diversité et de la systématique du genre *Vanilla* a été acquise notamment grâce à l'utilisation des marqueurs moléculaires. Ces travaux ont permis de mieux positionner les vanilliers au sein de la grande et ancienne famille des Orchidaceae et de proposer une révision de la subdivision du genre *Vanilla* en deux sous genres et deux sections. Néanmoins, en tant que groupe taxonomique complexe formé d'une centaine de taxons, les vanilliers requièrent des travaux complémentaires pour élucider les relations interspécifiques prévalant au sein du genre. Ces données sont nécessaires, à la fois pour mieux organiser la préservation de la biodiversité naturelle souvent menacée, et pour faciliter les travaux d'amélioration génétique des espèces cultivées.

Les objectifs de ce stage ont été d'utiliser l'outil moléculaires pour : (1) produire une phylogénie du genre plus complète, à l'aide de marqueurs moléculaires déjà utilisés sur la famille des Orchidaceae ou le genre *Vanilla*, (2) de développer de nouveaux marqueurs permettant d'améliorer la phylogénie actuelle du genre *Vanilla*, notamment pour les groupes mal résolus, (3) d'identifier des spécimens inconnus de la collection du CRB Vatel à l'aide du « barcoding ».

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé pour cette étude comprend des échantillons frais de vanilliers issus des ombrières de la collection du CRB VATEL, des échantillons secs de tiges, racines ou feuilles de vanilliers collectés à Madagascar, Afrique du Sud, Comores et Mexique ainsi que des échantillons d'ADN préalablement extraits et stockés par l'équipe dans un congélateur à -20°C.

Le choix du matériel biologique s'est fait dans l'optique de réaliser une étude qui puisse être la plus globale possible en sélectionnant des vanilliers ayant des origines géographiques variées ou des morphologies florales ou végétatives bien distinctes. Aussi, 57 accessions de vanilliers foliés et 26 accessions de vanilliers aphylls ont été sélectionnées pour cette étude dont 48 accessions originaires du continent américain, 34 du continent africain ou de la zone Océan Indien, et deux d'Asie. Ont été ensuite rajoutés 11 spécimens hybrides ainsi que neuf espèces n'ayant pas encore été identifiées. Les informations sur les accessions sélectionnées sont données dans le tableau 1.

Extraction et préparation des ADN

Les ADN de vanilliers (0.02g par échantillons) ont été extraits à l'aide du kit Qiagen®DNEasy Plant Mini Kit (Venlo, Pays-Bas), puis resuspendus dans 60µL de tampon d'élution. La concentration et la pureté des ADN extraits ont ensuite été vérifiées par un dosage spectrophotométrique au NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer (ThermoScientific).

Choix des marqueurs, et sélection/conception des amorces

Quatre marqueurs chloroplastiques et deux marqueurs nucléaires ont été sélectionnés pour cette étude. Les marqueurs chloroplastiques *psaB*, *psbC*, *rbcL* et *matK* avaient déjà été utilisés dans des études précédentes sur la phylogénie des Orchidaceae (Cameron, 2004 ; Cameron & Molina, 2006 ; Bouetard *et al.*, 2010 ; Khew & Chia, 2011). Ceci a permis d'utiliser des amorces déjà testées sur le genre *Vanilla* (pour *psaB*, *psbC* et *rbcL*) et sur des orchidées (pour *matK*) (tableau 2). L'espaceur intergénique des régions chloroplastiques *trnH-psbA* a été ajouté, car il avait été évalué comme une région potentiellement informative en terme d'identification d'espèces (une fois couplée avec des séquences codantes du gène chloroplastique *rbcL*) (Kress & Erickson, 2007). Enfin, les amorces des espaceurs intergéniques nucléaires ITS1 et ITS2 (Internal Transcribed Spacer), ont déjà été utilisées chez le genre *Vanilla* (Lubinsky *et al.*, 2008 ; Pansarin *et al.*, 2008 ; Belanger *et al.*, 2011 ; Ah-Peng & Payet, 2011) mais sur peu d'accessions. Il s'agit

Acc.	Origine	Caract. végét.	Espèce	sous-esp	Acc.	Origine	Caract. végét.	Espèce	sous-esp
CR0001	Américaine	Foliée	<i>planifolia</i> (Jacks.)		CR0686	Américaine	Foliée	<i>Odorata</i> (C. Presl)	
CR0003	Américaine	Foliée	<i>Hyb. pla X tah</i>		CR0691	Américaine	Foliée	<i>pompona</i>	<i>pompona</i>
CR0008	Américaine	Foliée	<i>planifolia</i>		CR0693	Américaine	Foliée	<i>pompona</i>	<i>grandiflora</i>
CR0017	Américaine	Foliée	<i>Xtahitensis</i> (J.W.Moore)		CR0694	Afrique	Aphyllé	<i>Madagascariensis</i> (Rolfe)	
CR0018	Américaine	Foliée	<i>Pompona</i> (Schiede)	<i>pittieri</i>	CR0697	Afrique	Aphyllé	<i>sp.</i>	
CR0020	Américaine	Foliée	<i>planifolia</i>		CR0699	Afrique	Aphyllé	<i>sp.</i>	
CR0024	Américaine	Foliée	<i>planifolia</i>		CR0794	Américaine	Aphyllé	<i>dilloniana</i>	
CR0038	Américaine	Foliée	<i>planifolia</i>		CR0796	Afrique	Foliée	<i>imperialis</i> (Kraenzl.)	
CR0052	Américaine	Foliée	<i>pompona</i>		CR0802	Américaine	Foliée	<i>planifolia</i>	
CR0059	Asiatique	Foliée	<i>albida</i> (Blume)		CR0810	Afrique	Aphyllé	<i>roscheri</i> (Rchb.f.)	
CR0064	Américaine	Foliée	<i>pompona</i>	<i>pompona</i>	CR0811	Afrique	Aphyllé	<i>madagascariensis</i>	
CR0068	Américaine	Foliée	<i>Hyb 068</i>		CR0812	Afrique	Aphyllé	<i>madagascariensis</i>	
CR0070	Américaine	Foliée	<i>pompona</i>	<i>longicarpa</i>	CR0819	Afrique	Aphyllé	<i>madagascariensis</i>	
CR0071	Américaine	Foliée	<i>bahiana</i> (Hoehne)		CR0820	Afrique	Aphyllé	<i>madagascariensis</i>	
CR0079	Américaine	Foliée	<i>pompona</i>	<i>grandiflora</i>	CR0891	Américaine	Foliée	<i>palmarum</i>	
CR0081	Américaine	Aphyllé	<i>dilloniana</i> (Correll)		CR1051	Américaine	Foliée	<i>Mexicana</i> (Mill.)	
CR0083	Américaine	Foliée	<i>palmarum</i> (Salzm.)		CR1444	Afrique	Aphyllé	<i>roscheri</i>	
CR0086	Américaine	Foliée	<i>bahiana</i>		CR1522	Américaine	Foliée	<i>sp.</i>	
CR0087	Américaine	Foliée	<i>insignis</i> (Ames)		CR1524	Américaine	Foliée	<i>sp.</i>	
CR0088	Afrique	Aphyllé	<i>sp.</i>		CR1525	Américaine	Foliée	<i>sp.</i>	
CR0091	Afrique	Foliée	<i>Ramosa</i> (Rolfe)		CR1526	Américaine	Foliée	<i>sp.</i>	
CR0096	Américaine	Foliée	<i>pompona</i>	<i>grandiflora</i>	CR1529	Américaine	Foliée	<i>sp.</i>	
CR0098	Américaine	Foliée	<i>bahiana</i>		CR1544	Américaine	Foliée	<i>Hyb. Pla? X pom?</i>	
CR0099	Américaine	Foliée	<i>bahiana</i>		CR1545	Américaine	Foliée	<i>Hyb. Pla? X pom?</i>	
CR0100	Américaine	Foliée	<i>sp.</i>		CR1550	Américaine	Foliée	<i>Hyb. Pla? X pom?</i>	
CR0101	Afrique	Aphyllé	<i>Sp.</i>		CR1559	Américaine	Foliée	<i>pompona</i>	
CR0102	Afrique	Foliée	<i>crenulata</i> (Rolfe)		CR1643	Américaine	Foliée	<i>lindmaniana</i>	
CR0103	Afrique	Foliée	<i>africana</i> (Lindl.)		CR1646	Afrique	Aphyllé	<i>Perieri</i> (Schltr.)	
CR0104	Afrique	Foliée	<i>imperialis</i>		CR1648	Afrique	Aphyllé	<i>roscheri</i>	<i>nd</i>
CR0106	Afrique	Foliée	<i>crenulata</i>		CR1682	Afrique	Aphyllé	<i>Sp.</i>	
CR0107	Afrique	Foliée	<i>africana</i>		CR1683	Afrique	Aphyllé	<i>Sp.</i>	
CR0108	Afrique	Aphyllé	<i>humblotii</i> (Rchb.f.)		CR1851	Afrique	Aphyllé	<i>humblotii</i>	
CR0109	Américaine	Foliée	<i>cribbiana</i> (Soto Arenas)		CR1876	Afrique	Aphyllé	<i>humblotii</i>	
CR0116	Américaine	Foliée	<i>insignis?</i>		CR1881	Afrique	Aphyllé	<i>roscheri</i>	
CR0117	Américaine	Foliée	<i>sp.</i>		CR1923	Américaine	Foliée	<i>pompona</i>	
CR0122	Américaine	Foliée	<i>cribbiana</i>		CR2108	Américaine	Foliée	<i>Hyb. bah X lind</i>	
CR0131	Afrique	Foliée	<i>Tsytaitra</i>		CR2117	Afrique	Aphyllé	<i>cf madagsacariensis</i>	
CR0139	Afrique	Foliée	<i>Hyb. pom X plan</i>		CR2118	Afrique	Aphyllé	<i>cf madagsacariensis</i>	<i>nd</i>
CR0141	Afrique	Aphyllé	<i>Sp.</i>		CR2119	Afrique	Aphyllé	<i>cf madagsacariensis</i>	
CR0142	Afrique	Aphyllé	<i>Sp.</i>		CR2120	Afrique	Aphyllé	<i>cf madagsacariensis</i>	
CR0145	Asiatique	Aphyllé	<i>aphylla</i> (Blume)		CR2121	Afrique	Aphyllé	<i>cf madagsacariensis</i>	
CR0146	Afrique	Aphyllé	<i>sp.</i>		CR2124	Afrique	Aphyllé	<i>françoisii</i> (H.Perrier)	
CR0153	NC	NC	<i>sp.</i>		CR2127	Afrique	Foliée	<i>françoisii</i>	
CR0163	Américaine	Foliée	<i>xtahitensis</i>		CR2128	Afrique	Foliée	<i>françoisii</i>	
CR0164	Américaine	Foliée	<i>xtahitensis</i>		CR2130	Afrique	Foliée	<i>françoisii</i>	
CR0166	Américaine	Foliée	<i>Hyb. 166 pla x bah</i>		CR2131	Afrique	Foliée	<i>françoisii</i>	
CR0174	Américaine	Foliée	<i>sp.</i>		CR2142	Américaine	Foliée	<i>mexicana</i>	
CR0196	Américaine	Foliée	<i>planifolia</i>		CR2144	Américaine	Foliée	<i>mexicana</i>	
CR0666	Américaine	Foliée	<i>chamissonis</i> (Klotzsch)		CR2154	Américaine	Foliée	<i>odorata</i>	
CR0668	Américaine	Foliée	<i>bahiana</i>		CR2156	Américaine	Foliée	<i>tahitensis wild</i>	
CR0682	Américaine	Foliée	<i>lindmaniana</i> (Kraenzl.)		CR2157	Américaine	Foliée	<i>pla x pom</i>	
CR0683	Américaine	Foliée	<i>Hyb. pom? X pla?</i>		CR2158	Américaine	Foliée	<i>pom x pla</i>	

Tableau 1 : Liste des accessions de vanilliers utilisés pour cette étude. Sont indiqués, le numéro d'accension, l'origine de l'espèce, les caractères « aphyllé » ou « foliée » ainsi que le nom d'espèce et la sous-espèce

de régions non codantes de l'ADN, séparant les régions codantes des sous-unités ribosomiques 18S et 5.8S (ITS1), 5.8S et 26S (ITS2) (Baldwin *et al.*, 1995). Les amorces universelles amplifiant le fragment ITS1, 5.8S et ITS2 ont été utilisées (tableau 2).

Plusieurs couples d'amorces ont également été conçus durant cette étude sur des gènes nucléaires candidats. L'intérêt était de trouver les parties introniques des gènes susceptibles de montrer des variabilités inter-spécifiques. En se basant sur une récente étude proposant des séquences génomiques du bananier (D'Hont *et al.*, 2012), des travaux de séquençage de vanilliers (Fock-Bastide, données non publiées) ainsi qu'avec des données issues d'une collaboration avec le laboratoire JCVI (USA) (Besse, données non publiées), des couples d'amorces ont été conçus pour tenter d'amplifier, puis de séquencer les hypothétiques introns des gènes PAL (Phénylalanine ammonia-lyase) et C4H (cinnamate-4-hydroxylase) pour les espèces du genre *Vanilla*. Ces marqueurs ont été choisis en supposant que les introns sur les gènes PAL et C4H du bananier sont présents également chez le genre *Vanilla*, ce qui est plausible étant donné que ces plantes sont toutes deux des monocotylédones et qu'elles sont relativement proches phylogénétiquement. Ces deux gènes, qui codent pour des enzymes dans le métabolisme primaire des plantes, sont hypothétiquement des bons candidats pour du barcoding. On les trouve dans l'ensemble du Règne végétal, ce qui suppose que les séquences d'ADN sont très conservées entre les différents genres ou famille de plantes. Pour trouver les parties introniques chez chacun des gènes, les alignements des différentes séquences (ADN génomique + ADN complémentaire) du bananier ont été faits à l'aide du logiciel Bioedit Sequence Alignment Editor v.5.0.9 (Hall, 1999). A cet alignement ont été ajoutées des séquences codantes de vanilliers pour chacun des gènes. Une séquence composite a ensuite été créée combinant des séquences du gène candidat de banane et de vanillier. De cette séquence composite, nous avons défini des amorces à l'aide du logiciel primer3+ (Rozen & Skaletsky, 2000), encadrant les trois introns visés (tableau 2).

Amplification des fragments cibles par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les fragments d'ADN d'intérêt ont été amplifiés par PCR en utilisant un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied biosystems, Foster City, California, USA). Chaque réaction a été faite dans une solution de 25 µL comprenant 2.5µL d'ADN matrice à 10ng/µL, 1.5µL de MgCl₂ à 25mM, 0.5µL de dNTPs à 10mM, 1.5µL de chacune des amorces (Forward et Reverse) à 5mM, 5µL de tampon PCR (Green flexi buffer, GoTaq®DNA polymerase) à 5X et 0.20µL (1 unité) de GoTaq® DNA Polymerase (Promega). Les programmes PCR utilisés peuvent varier suivant la longueur du brin d'ADN à amplifier ou encore suivant la température d'hybridation des amorces (tableau 2). Ils se composent : d'une phase de dénaturation des brins d'ADN pendant 3 minutes à 95°C puis d'une phase de 35-40 cycles comprenant : une phase de

Couple d'amorces	Séquence 5' > 3'	Long.amorces (pb)	TM (°C)	Long.fragment (pb)
Locus <i>psaB</i>				
<i>psaB</i> 49L/	CCGTCGCAAGGAAAACCTATAA	21	53	800
<i>psaB</i> 848R	TTCGGGATTGGTCACAGTAT	20	53	
<i>psaB</i> 766L/	AGACCCTTATGYCCACGYC	19	51	761
<i>psaB</i> 1526R	GCTTGGCAAGGAAATTTTGA	20	51	
Locus <i>psbC</i>				
<i>psbC</i> 25L/	GGTCTGGCTCTGAACCTACG	20	55	762
<i>psbC</i> 786R	GGGCTAAGGGTCAARTTGGT	20	55	
<i>psbC</i> 596L/	TCCTTTCCATTCTTCGGTTATG	22	55	784
<i>psbC</i> 1379R	AAGAACCTAAAGGAGCATGAGTC	23	55	
Locus <i>rbcL</i>				
<i>rbcL</i> 33L/	CTCCTGACTACGAAACCAAAGA	22	55	698
<i>rbcL</i> 730R	TCTCTGGCAAATACCGCTCT	20	55	
<i>rbcL</i> 453L/	TCGTCCCTATTGGGATGTA	20	55	779
<i>rbcL</i> 1231R	CCTCATTACGAGCTTGCACA	20	55	
Locus ITS				
AB101F/	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTT C	27	60	800
AB102R	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTT C	27	60	
locus <i>matK</i>				
<i>matK</i> 743F/	CTTCTGGAGTCTTTCTTGAGC	21	56	777
<i>matK</i> 1520R	CGGATAATGTCCAAATACCAAATA	24	56	
Locus <i>trnH-psbA</i>				
<i>trnH_tate_F</i> /	CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC	23	66,4	58,4
<i>psbA_Clark</i>	GTWATGCAYGAACGTAATGCTC	22	58,4	
Locus PAL				
PAL232-21Fd/	AGCTGAAGATATCGCAGGTSG	21	59	712
PAL744-19R1	TGATGGTCCCTCGGGTAGG	19	59	
Locus C4H				
C4H1i1-716F/	TTAGGATCTGCAAGGAGGTCA	21	55	320
C4Hci1-951Rd	CGTTWATCTCGCCCTTCYTC	20	55	
C4H2i2-903F/	TGCGCAATAGATCACATTCTG	21	55	1195
C4H2i2-1298R	CCGGCTCTGTAATCTGAACG	20	55	

Tableau 2 : Liste des différentes amorces utilisées pour cette étude. Sont indiqués pour chaque amorce, le nom du locus amplifié, la séquence nucléotidique et sa taille, la température d'hybridation utilisée, ainsi que la taille du fragment attendu.

dénaturation des acides nucléiques de 45 secondes à 95°C, une phase d'hybridation des amorces de 45 secondes (température variable selon les marqueurs), et une phase de synthèse du brin d'ADN de 1'30 minutes à 2 minutes à 72°C. Le programme PCR se termine par une phase d'élongation finale à 72°C pendant 7 minutes. Les températures d'hybridation et les temps d'élongation utilisés pour les différentes amorces sont décrites dans le tableau 2. L'amplification des fragments d'intérêts a été vérifiée après migration des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% suivi d'une coloration au bromure d'éthidium (BET) puis d'une révélation sous lumière ultraviolette.

Clonage

Après vérification sur gel d'agarose, l'amplification des fragments d'ADN du marqueur ITS a donné des amplifiats de la taille attendue pour la plupart des accessions, et des amplifiats de tailles différentes pour certaines accessions (détectés par une double bande sur les gels). Il a donc été décidé de cloner les produits PCR des accessions où l'on observait plusieurs bandes ou où le bruit de fond était trop important, ainsi que les accessions hybrides, qui, de par leur parenté, peuvent avoir un fragment amplifié de même taille mais de nature différente. Ceci a été fait dans l'optique d'avoir des séquences propres et de bonne qualité à exploiter. Les fragments ont été insérés dans des vecteurs pGEM®-T Easy (Promega, Madison, Wisconsin, USA) qui contiennent un gène de résistance à l'ampicilline et un gène codant pour la β -galactosidase dans lequel vient se positionner l'insert. Après ligation, les plasmides ont été transférés dans des bactéries compétentes *Escherichia coli* JM 109 (Promega). Les colonies ayant intégrées un plasmide recombinant ont été sélectionnées après étalement sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB (nutritif) avec de l'ampicilline (antibiotique), du X-Gal (galactosidase, équivalent coloré du lactose qui sera dégradé par les bactéries n'ayant pas intégré l'insert) et de l'IPTG (isopropylthio- β -D-galactosidase, inducteur permettant à la cellule de métaboliser le X-Gal). Ainsi les colonies restées blanches (c'est-à-dire ayant intégré l'insert) ont été sélectionnées et remises en culture sur des nouvelles boîtes de pétri. Une amplification par PCR a été faite pour chacune des colonies blanches. Chaque réaction a été faite dans une solution de 25 μ L comprenant 1.5 μ L de $MgCl_2$ à 25mM, 1.5 μ L de dNTPs à 2mM, 1 μ L de chacune des amorces universelles (M13 Forward et M13 Reverse) à 20mM, 5 μ L de tampon PCR (Green flexi buffer, GoTaq®DNA polymerase) à 5X et 0.15 μ L (0.8 unité) de GoTaq® DNA Polymerase (Promega). Dans cette solution a été trempée une anse sur laquelle avait été récupérée une partie de la colonie blanche. Le programme PCR se compose d'une phase de dénaturation des brins d'ADN pendant 3 minutes à 95°C puis d'une phase de 30 cycles comprenant : une phase de dénaturation des acides nucléiques de 45 secondes à 95°C, une phase d'hybridation des amorces de 45 secondes à 60°C, et une phase de synthèse du

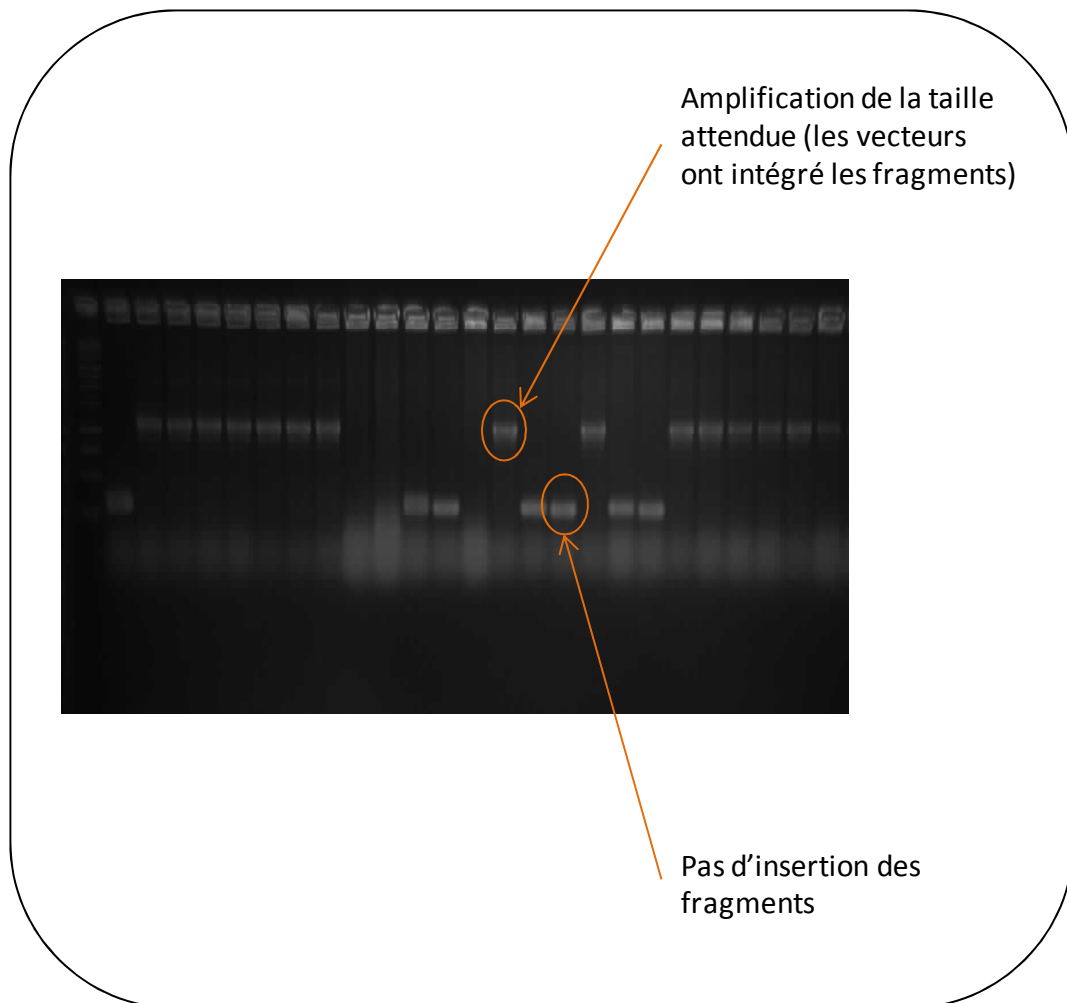


Figure 4 : Révélation au BET de la migration des clones ITS. Le marqueur de taille utilisé est le 1Kb. Les bandes signifient qu'un fragment d'ADN est amplifié. Les bandes supérieures correspondent à la taille du vecteur ayant intégré le fragment cible, les bandes inférieures à la taille du vecteur n'ayant pas intégré le fragment cible.

brin d'ADN de 1'30 minutes à 72°C. Le programme PCR se termine par une phase d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes. L'assimilation des fragments d'intérêts par les plasmides a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (figure 4). Après vérification, les colonies ayant intégrées les fragments d'intérêts ont été mises en tubes dans du glycérol puis envoyées à la société Beckman Coulter Genomics (United Kingdom) pour être séquencées.

Séquençage

Une partie des plaques et tubes contenant les produits PCR a été envoyée à séquencer au Centre National de Séquençage dans le cadre du projet Biliothèque du Vivant financé par le CNRS, le Museum National d'Histoire Naturelle, l'INRA et le CEA. L'autre partie des produits a été séquencé par la société Beckman Coulter Genomics au Royaume-Uni.

Traitement des séquences

Les séquences nucléotidiques ont été vérifiées par comparaison entre les électrophorégrammes obtenus à partir des amorces sens et anti-sens de chaque marqueur, à l'aide du logiciel Bioedit. Chaque base ambiguë a ainsi été vérifiée et corrigée manuellement afin d'assurer la cohérence entre les deux brins. Les alignements des séquences des différents gènes ont ensuite été faits *via* le programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), intégré au logiciel Bioedit, puis corrigés manuellement.

Construction des arbres phylogénétiques

Trois méthodes de reconstruction phylogénétique ont été utilisées : le Neighbor-Joining, le maximum de vraisemblance et la méthode Bayésienne, car elles présentent des caractéristiques différentes (Holder & Lewis, 2003). La technique du Neighbor-joining utilise une matrice des distances pour faire des regroupements entre taxons. Pour calculer ces distances, on rapporte le nombre de sites variables sur le nombre total de sites. A cette méthode est associé un test de robustesse, le bootstrap, qui permet de mesurer si les regroupements obtenus à partir de la méthode du Neighbor-joining, sont solides ou non. Les deux autres méthodes sont probabilistes, basées sur le concept de vraisemblance (Huelsenbeck & Bollback, 2001). La méthode du maximum de vraisemblance sélectionne l'arbre qui maximise la vraisemblance (c'est à dire l'arbre ayant la plus forte probabilité d'avoir conduit aux données), et l'approche Bayésienne assigne une distribution a priori aux différents arbres puis réalise des inférences à partir de la distribution des probabilités postérieures de ces arbres (Shoemaker *et al.*, 1999).

La construction d'arbres phylogénétiques à partir de la méthode du Neighbor-Joining à été faite avec le logiciel MEGA v.5 (Kumar *et al.*, 2004) à partir d'un alignement au format « fasta ». Les

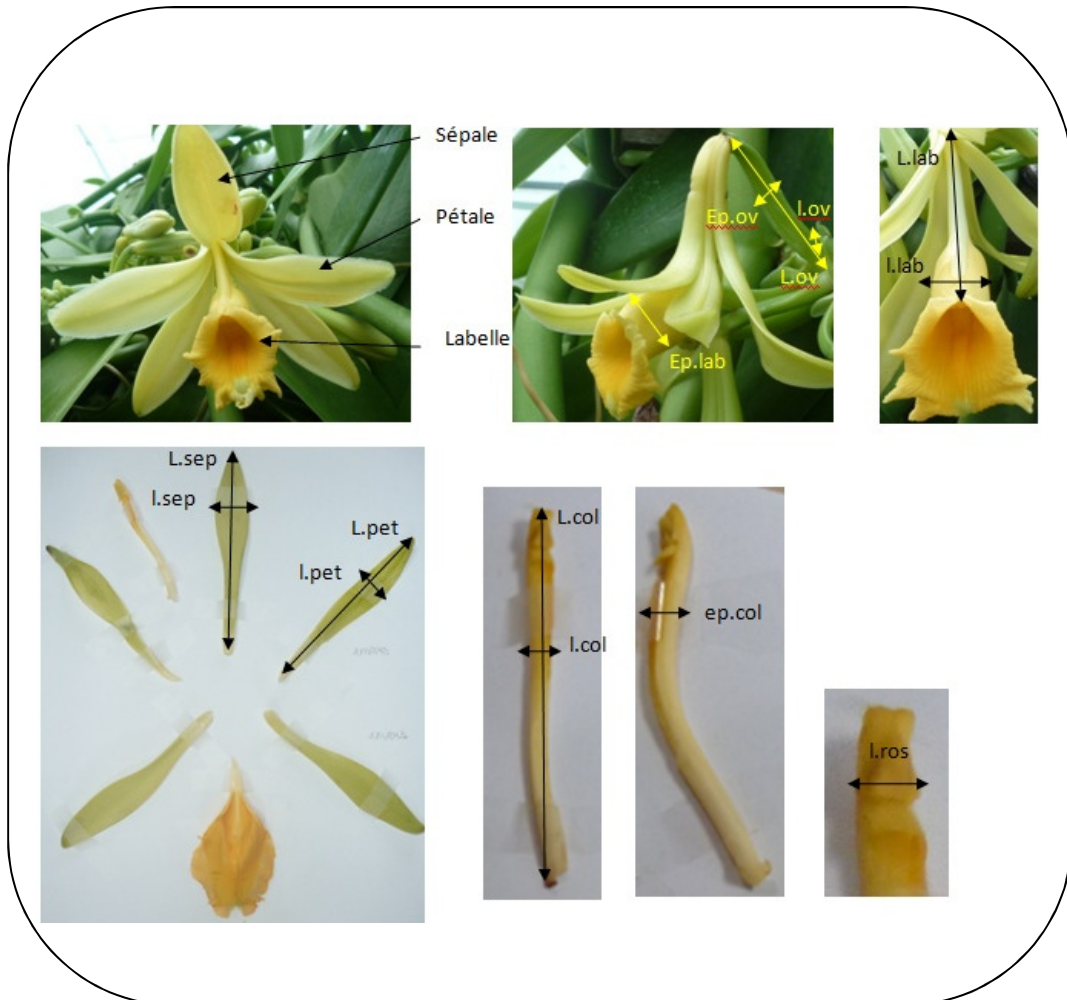


Figure 3 : mesure des traits floraux sur une *Vanilla pompona*. Ep.ov= épaisseur de l'ovaire, L.ov=longueur de l'ovaire, l.ov=largeur de l'ovaire, Ep.lab=épaisseur du labelle, L.lab=longueur du labelle, l.lab=largeur du labelle, Ep.col=épaisseur de la colonne, L.col=longueur de la colonne, l.col=largeur de la colonne, L.sep=longueur des sépales, l.sep=largeur des sépales, L.pet=longueur des pétales, l.pet=largeur des pétales.

fichiers contenant les séquences alignées ont été convertis à l'aide du logiciel Mesquite v.2.75 (Maddison & Maddison, 2011) en format *phylip* pour les analyses en maximum de vraisemblance, et en format *nexus* pour les analyses Bayésiennes.

Pour les analyses de MV et les analyses Bayésiennes, Le modèle d'évolution qui explique le mieux les données a été sélectionné par le logiciel ModelTest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) en utilisant le critère AIC. Le même modèle a été sélectionné pour tous les marqueurs et correspond au General Time Reversible (GTR) avec une proportion de sites invariants et la distribution gamma, qui correspond au taux de substitutions (GTR + I + G).

L'analyse du maximum de vraisemblance a été effectuée avec PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel, 2003). Une analyse de bootstrap (Felsenstein, 1985) avec 100 réplifications a été employée pour estimer la robustesse de chaque noeud. L'analyse bayésienne a été réalisée à l'aide du logiciel MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Les analyses (4 chaînes de Markov) ont été conduites sur 5 millions de générations avec un échantillonnage des arbres et des paramètres toutes les 100 générations (soit 50000 jeu de données).

Les arbres ont été visualisés avec le logiciel R v.2.15.1 en utilisant les packages *ape* et *Maptree*. Pour les trois méthodes de reconstruction, les mêmes groupes externes ont été utilisés pour enraciner les arbres. Il s'agit des accessions correspondant à l'espèce *V. mexicana* qui fait figure d'outgroup dans le genre *Vanilla* (Bouetard *et al.*, 2010).

Mesure des traits floraux

Des mesures florales ont été réalisées de mars à août, au fur et à mesure des floraisons des différentes accessions de vanillier des ombrières du CRB Vatel (Roux-Cuvelier & Grisoni, 2010). Au total, les fleurs de 28 accessions et 9 espèces ont été mesurées. Pour chaque accession, les mesures de 8 fleurs (si possible) ont été faites à l'aide d'un pied à coulisse. Pour chaque fleur, les paramètres suivant ont été mesurés : le poids total de la fleur, le poids, la longueur, la largeur et l'épaisseur de l'ovaire, les longueurs et largeurs des sépales, les longueurs et largeurs des pétales, la longueur, la largeur et l'épaisseur du labelle, la hauteur de l'entrée du labelle, la longueur, la largeur et l'épaisseur de la colonne et la largeur du rostellum (figure 3).

Analyse statistique des traits floraux

Les variations intra-spécifiques des traits floraux ont été analysées par Analyse en Composante Principale (ACP) à l'aide du logiciel R v2.15.(fonction *acp()* du package *ade4*), pour déterminer les variables permettant de différencier au mieux des groupes morphologiques. Ensuite, la significativité des différences entre les groupes mis en évidence par l'ACP a été déterminée pour l'ensemble des variables à l'aide d'une Analyse Multivariée des Variances Non Paramétrique, (npMANOVA, fonction *adonis()* du package *vegan*) en utilisant l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis ainsi que 10000 permutations. Le même test a été utilisé en *post hoc*.

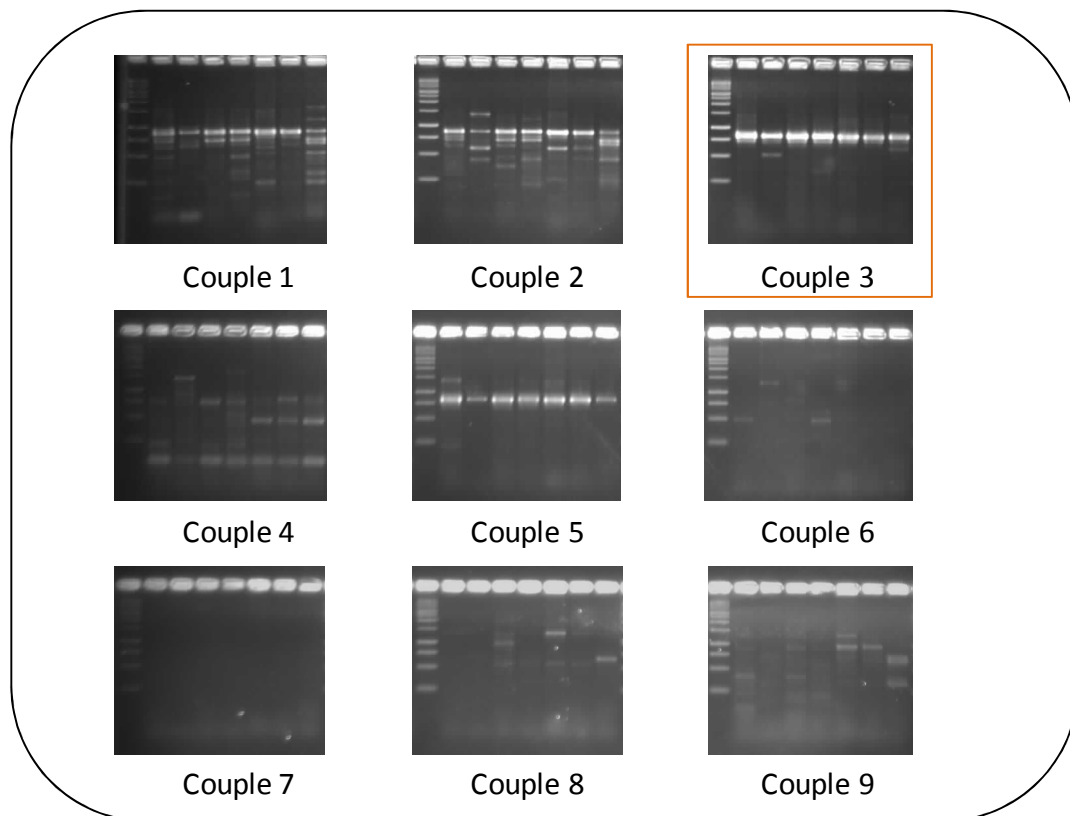


Figure 5. Résultats des tests fait à partir des amorces du marqueur PAL révélés au BET. Le couple 3 (en orange) a été sélectionné.

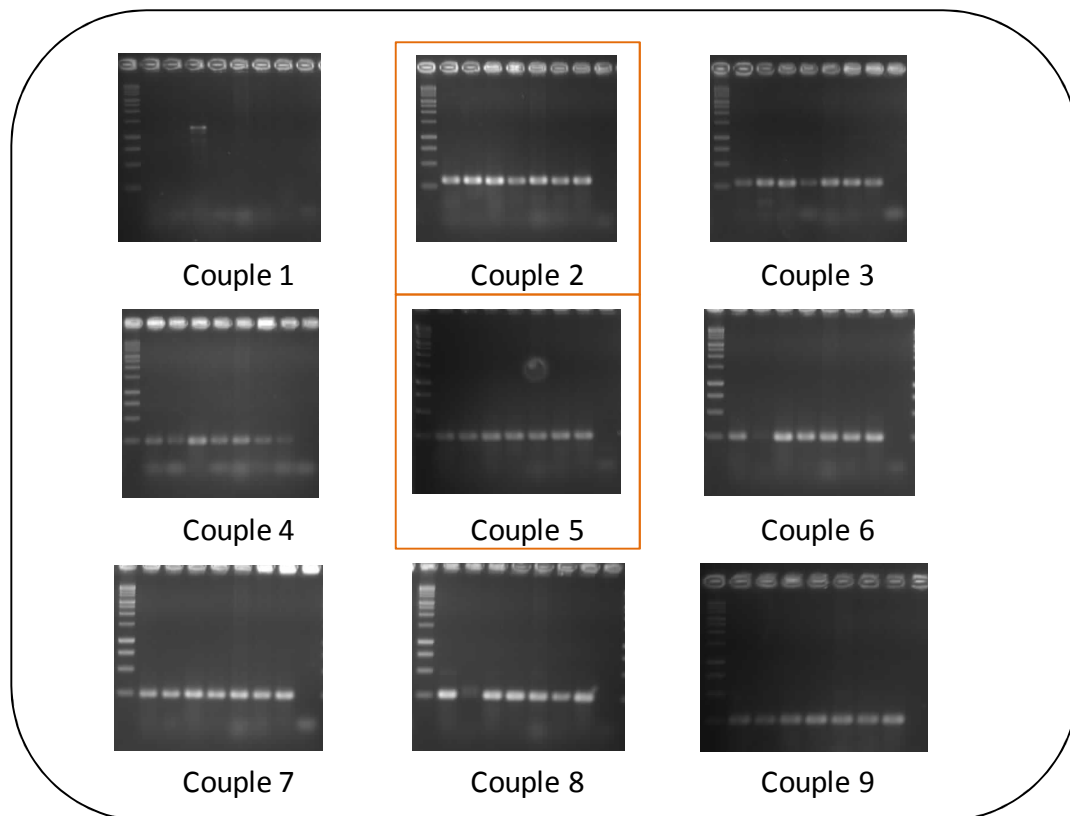


Figure 6. Résultats des tests fait à partir des amorces du marqueur C4H révélés au BET. Les couple 2 et 5 (en orange) ont été sélectionnés.

Résultats

Recherche de marqueurs introniques dans deux gènes du métabolisme des phenylpropanoïdes

Des marqueurs introniques ont été recherchés sur les gènes nucléaires PAL (Phénylalanine ammonia-lyase) et C4H (cinnamate-4-hydroxylase). L'alignement des séquences exprimées (EST) de *V. planifolia* disponibles avec notamment le génome du bananier, a révélé des introns susceptibles d'être amplifiés et séquencés par PCR. Pour le gène PAL, neuf couples d'amorces ont été conçus pour tenter d'amplifier une zone intronique de 85pb (annexe 1). Ces amorces ont été testées sur sept espèces de vanilliers. Après vérification sur gel d'agarose, et séquençage des amplifiats, le couple d'amorce (232.21Fd/744.19R1) produisant un fragment de 781pb, a été sélectionné (figure 5). Pour le gène C4H, deux zones introniques ont été identifiées *in silico*, l'une de 85pb, l'autre de 840pb (figure 6). Six couples d'amorces ont été créés pour l'amplification de l'intron 1, et trois couples pour l'intron 2. Les vérifications sur gel d'agarose suggèrent que seul l'intron 1 est présent chez le genre *Vanilla*. Le fragment amplifié à l'aide des couples d'amorces de l'hypothétique intron 2 ont une taille (282pb) correspondant à la seule partie exonique.

Analyse phylogénétique

Parmi les 103 accessions étudiées, toutes n'ont pu donner des séquences exploitables pour les 6 régions géniques analysées. Le gène chloroplastique *rbcL* initialement prévu dans l'analyse a été correctement amplifié pour l'ensemble des accessions mais n'a pas pu être exploité en raison d'un incident dans le transport des échantillons au laboratoire de séquençage. Le gène nucléaire C4H n'a été utilisé que sur sept accessions de vanilliers.

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées séparément sur les 4 types de *loci*. Les trois gènes chloroplastiques concaténés (*psaB*, *psbC*, *matK*), l'espaceur intergénique de l'ADN ribosomal (ITS), et le gène nucléaire (PAL). Pour chacun de ces *loci*, 3 méthodes phylogénétiques ont été appliquées (Neighbor-joining, Maximum de vraisemblance et méthode Bayésienne) conduisant à la construction de trois arbres par *locus*.

Pour chacun des *loci*, les topologies des arbres obtenus avec les trois méthodes d'analyse sont congruentes. Les arbres obtenus avec la méthode Bayésienne (dont les valeurs de nœuds à chaque branche de l'arbre sont les plus fiables) sont présentés sur les figures 7, 8 et 9. Les

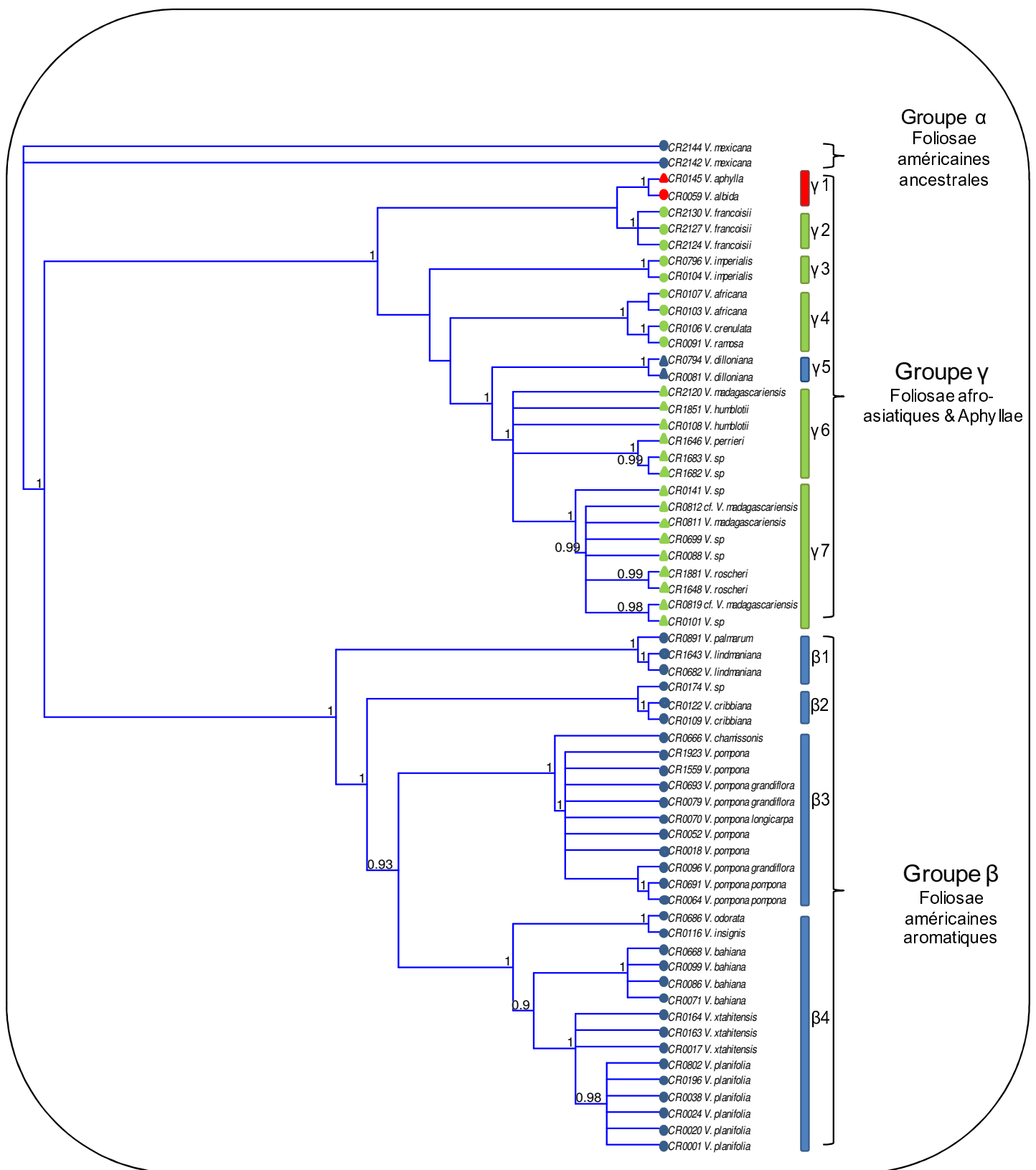


Figure 7 : Phylogramme obtenu avec l'analyse bayésienne du jeu de séquences amplifié et concaténé des gènes *psaB*, *psbC* et *matK*. Les caractères « aphyllé » (▲) et « folié » (●) sont précisés, ainsi que l'origine géographique (Amérique en bleu, Asie en rouge et Afrique en vert). Les probabilités supérieures à 0.9 sont affichées.

arbres obtenus avec les méthodes du Neighbor-joining et du Maximum de vraisemblance sont insérés dans les annexes 2 et 3.

Compte tenu des nombreux évènements d'insertion-délétion révélé par l'alignement des séquences issues de l'intergène chloroplastique (*trnH-psbA*), ce *locus* a été analysé à l'aide d'une méthode prenant en compte les gaps présents dans l'alignement (en tant que « cinquième nucléotide »), avec le logiciel Darwin (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006), (Annexe5).

La structure globale des arbres obtenus fait ressortir d'emblée les subdivisions majeures du genre récemment proposées par différents auteurs (Bouetard *et al.*, 2010 ; Soto Arenas & Cribb, 2010 ; Cameron 2011). Tout d'abord, le clade α comprenant les vanilliers foliés correspondant à la sous-section des Membranaceae de Portères (1954) et au sous-genre *Vanilla* proposé par Soto Arenas & Cribb (2010). Dans notre étude, le clade α est représenté uniquement par l'espèce américaine ancestrale *V. mexicana*. Elle est utilisée en tant que groupe externe pour enraciner les arbres phylogénétiques. Le clade β rassemble les vanilliers Foliosae américains (dans lequel on trouve les vanilliers dont les gousses possèdent des propriétés aromatiques) et correspond à la section *Xanata* du sous genre *Xanata* (Soto Arenas & Cribb, 2010). Le clade γ rassemble tous les vanilliers aphylls (section Aphyllae de Portères, 1954) ainsi que les vanilliers foliés originaires du vieux monde (Afrique, Océan Indien et Asie), constituant la section *Xanata Tethya* (Soto Arenas & Cribb 2010). A la base de chacune de ces sous-divisions, on trouve un nœud robuste ayant une probabilité postérieure (PP) égale à 1 et une valeur de bootstrap supérieure à 95%.

Les clades β et γ sont subdivisés respectivement en 4 et 7 sous-clades présents et fortement ou très fortement supportés par les différentes méthodes d'analyse. Leurs structures sont détaillées ci-après pour les trois gènes analysés.

Séquences chloroplastiques codantes (psaB, psbC et matK)

L'alignement et la concaténation des différentes séquences des gènes *psaB*, *psbC* et *matK* a généré une matrice de 3459 nucléotides pour 62 accessions de *Vanilla* (2 dans le clade α , 32 pour β et 28 dans le clade γ). Certaines séquences *psaB* et *psbC* étaient présentes dans GenBank mais aucune séquence pour *matK*. Le clade β 1 est le premier à diverger (PP=1, figure 7) au sein du clade β (le clade des Foliosae américaines aromatiques). Il sépare (PP=1) les accessions de *V. lindmaniana* de celle de *V. palmarum*.

Les clades $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$ sont regroupés dans un ensemble (PP=1) bien distinct des espèces autofertiles du clade $\beta 1$. Dans le clade $\beta 2$, on trouve les deux accessions de l'espèce *V. cribbiana* (PP=1) et une accession non spécifiée. Le clade $\beta 3$ se scinde en deux clades: celui de l'accession *V. chamissonis* et celui des *V. pompona* (PP=1), dont les relations entre les sous-espèces ne sont pas élucidées, à l'exception de la sous espèce mexicaine *V. pompona pompona*. Le clade $\beta 4$ est divisé en 3 clades fortement soutenus. On note ainsi un clade composé de *V. odorata* et *V. insignis* (PP=1), un clade regroupant toutes les accessions de *V. bahiana* (PP=1), et un dernier clade (PP=1) qui comprend d'une part les accessions de *V. tahitensis* et d'autre part celles de *V. planifolia* (PP=0.98).

Le clade γ comprend sept clades tous soutenus par une PP=1. Le clade $\gamma 1$ rassemble les deux espèces asiatiques de notre étude, une aphyllé, *V. aphylla*, l'autre foliée, *V. albida*. Dans le clade $\gamma 2$, on trouve l'ensemble des accessions correspondant à la vanille foliée malgache, *V. cf. françoisii*. Le clade $\gamma 3$ contient deux accessions correspondant à l'espèce foliée *V. imperialis*. Dans le clade $\gamma 4$, on trouve un clade correspondant aux accessions de *V. africana* et un clade (PP=1) contenant les accessions de *V. crenulata* et *V. ramosa*. Les clades $\gamma 5$, et $\gamma 6$ et $\gamma 7$ sont groupés (PP=1). Le clade $\gamma 5$ comprend les accessions de vanilliers aphyllés originaires des Caraïbes, *V. dilloniana*. Les clades $\gamma 6$ et $\gamma 7$ rassemblent toutes les espèces aphyllés de l'Océan Indien étudiées. On y trouve des accessions provenant des Seychelles, des Comores, d'Afrique du Sud et de Madagascar mais qui sont mal identifiées au niveau taxonomique, exceptées les accessions des espèces *V. humblotii* et de *V. roscheri* caractérisées par Gigant (2012). L'accession *V. perrieri* est regroupée (PP=1) avec deux accessions d'espèces inconnues mais supposées *V. perrieri* (CR1683 et CR1682). Le deuxième clade soutenu dans $\gamma 7$ contient des espèces non identifiées ou assimilées à *V. madagascariensis*, et les accessions de *V. roscheri*, groupées ensembles (PP=0.99). Les accessions supposées appartenir à l'espèce *V. madagascariensis* ne sont donc pas regroupées.

Séquences de la région ITS

L'alignement des séquences du marqueur ITS a généré une matrice de 851 nucléotides pour 103 accessions. Parmi ces accessions, 10 proviennent de la banque de données GenBank (annexe 4). Sur cet arbre ITS (figure 8), on retrouve le clade α composés des trois accessions de *V. mexicana*, dont l'une (CR1051) diverge et est regroupée avec les clades γ et β (PP=1).

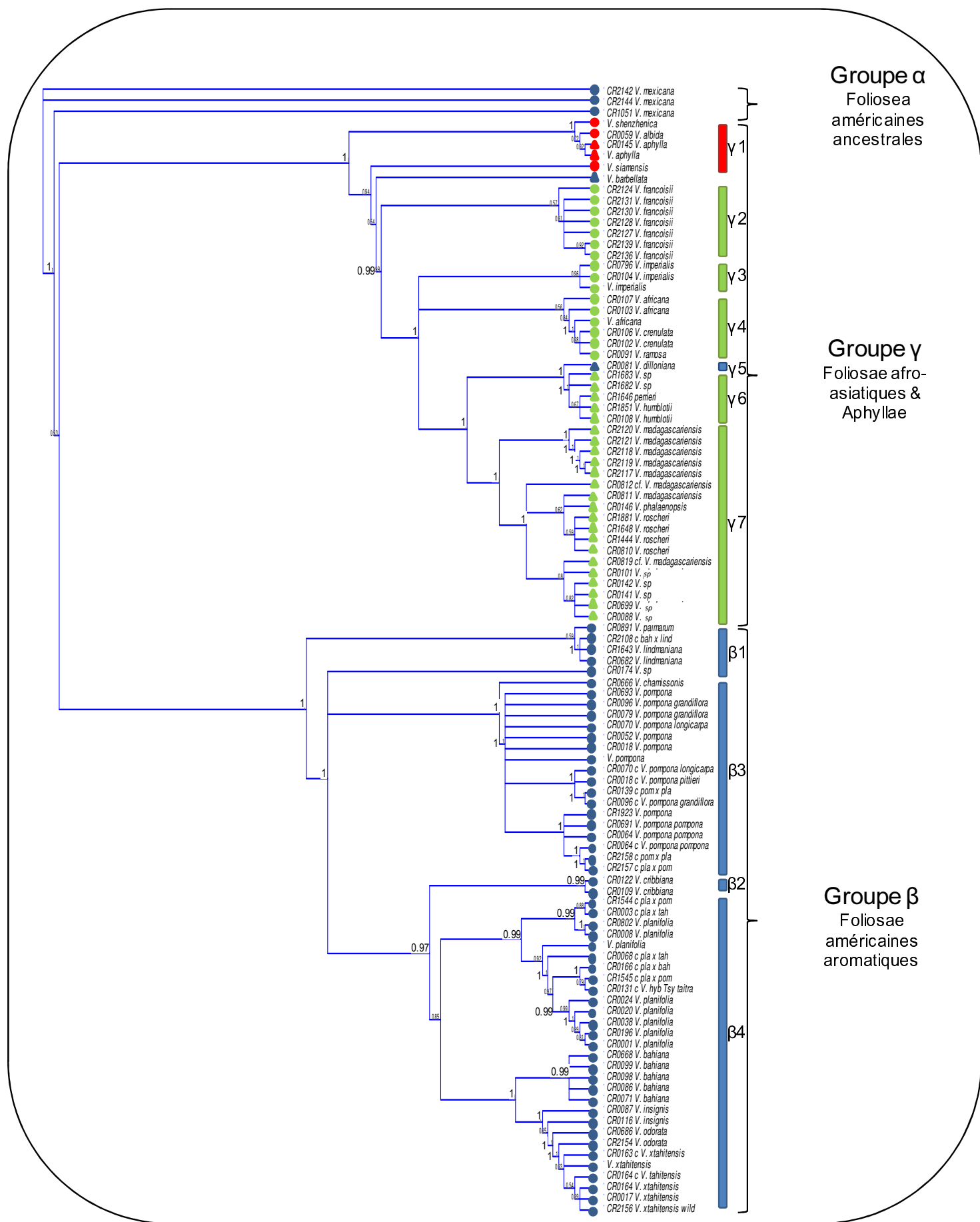


Figure 8 : Phylogramme obtenu avec l'analyse bayésienne du jeu de séquences amplifié avec les amorces ITS. Les caractères « aphyllé » (▲) et « folié » (●) sont précisés, ainsi que l'origine géographique (Amérique en bleu, Asie en rouge et Afrique en vert). Les probabilités supérieures à 0.9 sont mises en valeur.

Dans le clade $\beta 1$, qui est à nouveau le premier clade divergeant du reste du groupe β , on trouve les 4 accessions des espèces, *V. palmarum* et *V. lindmaniana* divisées en deux clades distincts (PP=1). L'hybride *V. bahiana* x *V. lindmaniana* est inclus dans le clade de son parent paternel *V. lindmaniana* (CR0682). Le clade $\beta 2$ de *V. cribbiana*, comme dans l'arbre « chloroplastique », est fortement soutenu (PP=0.99) mais paraît frère du clade $\beta 4$ et plus éloigné de l'accession CR0174. On retrouve également le clade $\beta 3$ (PP=1), composé de *V. chamissonis* et des *V. pompona* (PP=1). Au sein des espèces de *V. pompona*, deux sous-clades sont soutenus : l'un composé des sous-espèces *V. pompona longicarpa* (CR0070), *V. pompona pittieri* (CR0018), et d'un hybride malgache issu d'un croisement entre *V. pompona* et *V. planifolia*, groupé avec une accession de *V. pompona grandiflora* (PP=1); un second clade (PP=1) composé des accessions de *V. pompona pompona* originaires du Mexique, dont une des accessions est significativement regroupée (PP=1) avec les hybrides *pompona* x *planifolia* (CR2158) et *planifolia* x *pompona* (CR2157). Le clade $\beta 4$ n'est que faiblement soutenu (PP=0.85) mais dans ce clade on trouve d'une part un clade soutenu (PP=0.99) où se regroupent les espèces de *V. planifolia* ainsi que les hybrides *planifolia* x *tahitensis*, *planifolia* x *pompona*, *planifolia* x *bahiana*, et l'hybride Tsy taitra, issu d'un back-cross ((*planifolia* x *pompona*) x *planifolia*). D'autre part, on trouve un autre clade soutenu (PP=1), dans lequel on retrouve toutes les accessions de l'espèce *V. bahiana* (PP=0.99) et les accessions des espèces *V. insignis*, *V. odorata* et *V. xtahitensis* (PP=1).

Dans le clade γ on retrouve les sept sous-clades $\gamma 1$ à $\gamma 7$ bien soutenus. Cependant deux accessions issues de Genbank sont en situation polytomique à la base du clade γ : l'accession JF825978.1 (*V. siamensis*) proche des autres espèces asiatiques étudiées et rassemblées dans le clade $\gamma 1$ (PP=1), et l'accession FJ425835.1 (*V. barbellata*) qui est elle curieusement très éloignée de l'autre espèce aphyllle caribéenne *V. dilloniana* formant le clade $\gamma 5$ (PP=1). Les accessions de l'espèce *V. françoisii* forment un clade peu soutenu (PP=0.91), à la base du groupe formé des clades $\gamma 3$ à $\gamma 7$ (PP=1). Les relations entre $\gamma 3$ (*V. imperialis*) et $\gamma 4$ ne sont pas résolues. Les espèces africaines sont assez bien séparées en trois groupes : *V. imperialis* ($\gamma 3$), *V. africana* ($\gamma 4$), et *V. ramosa* indiscernable de *V. crenulata* ($\gamma 4$). Les clades $\gamma 5$ (*V. dilloniana*) et $\gamma 6$ (PP=1) groupés ensemble (PP=1) rapprochent les aphyllles caribéennes des aphyllles du groupe *humblotii/perrieri* (à fleurs jaunes) des aphyllles de l'Océan indien. Le reste des accessions aphyllles originaires de l'Océan Indien se scinde en deux groupes fortement soutenus : d'une part, cinq accessions malgaches, toutes issues d'une étude récente

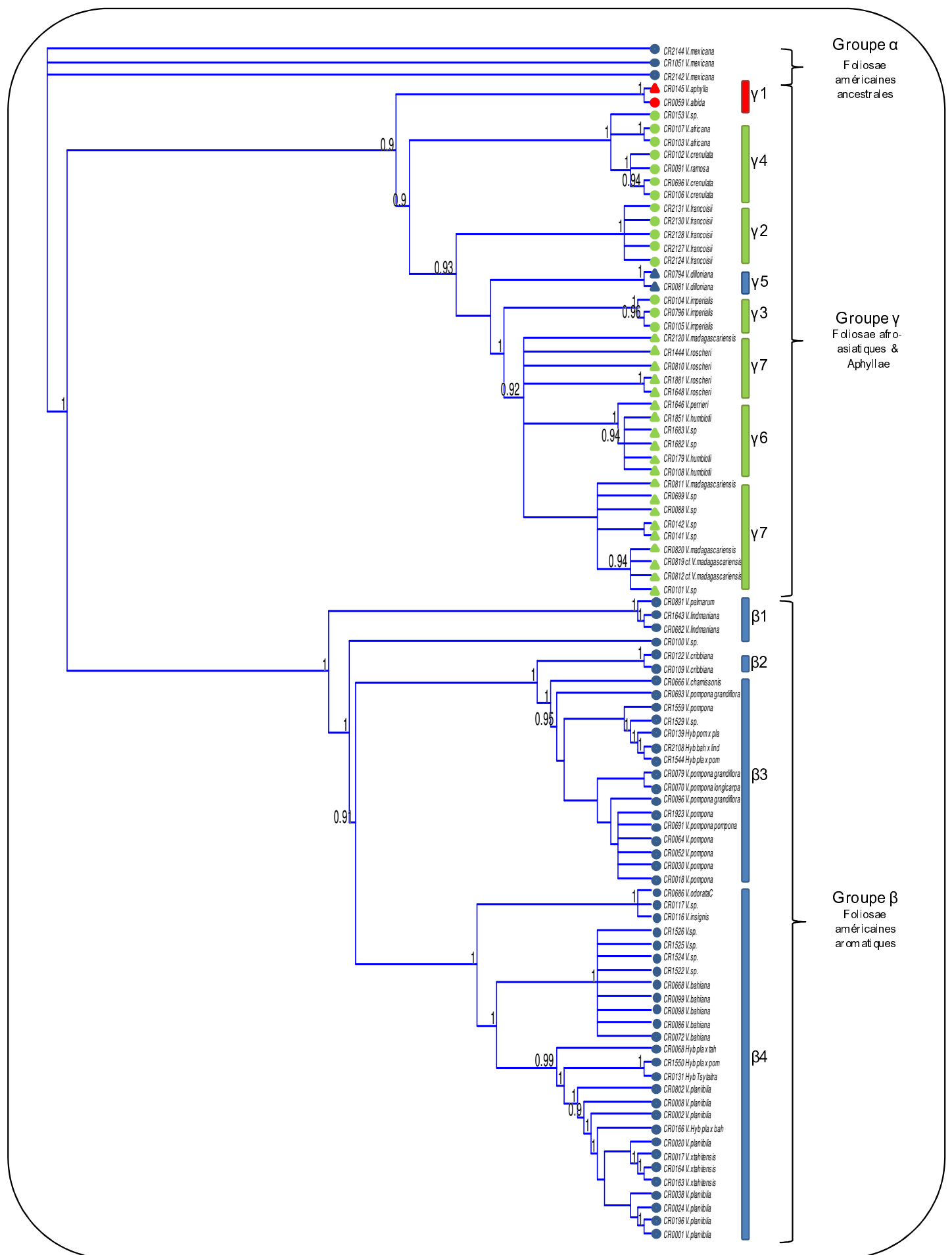


Figure 9 : Phylogramme obtenu avec l'analyse bayésienne du jeu de séquences amplifié avec les amorces PAL (232.21Fd/744.19R1). Les caractères « aphyllé » (▲) et « folié » (●) sont précisés, ainsi que l'origine géographique (Amérique en bleu, Asie en rouge et Afrique en vert). Les probabilités supérieures à 0.9 sont affichées.

dans la forêt d'Ambodiriana (Nord-Est de Madagascar) (Lauri, 2012) ; d'autre part un clade comprenant des accessions aphyllées dont la plupart sont à fleurs blanches mais demeurent mal spécifiées (*V. madagascariensis*, *V. phalaenopsis*, *V. roscheri*). Bien que peu soutenue (PP=0.59), on peut noter une individualisation des accessions de *V. roscheri* d'Afrique du Sud et de Zanzibar.

Séquence partielle du gène PAL

L'alignement des séquences du marqueur nucléaire PAL a généré une matrice de 715 nucléotides pour 91 accessions. Cette matrice contient un intron comportant 393 nucléotides ou gaps (8.55 gaps par séquence en moyenne) encadré par les fragments de l'exon1 (169 nt) et de l'exon2 (157 nt). Comme attendu cet intron présente un niveau de divergence supérieure à celui des exons 1 et 2 qui l'encadrent ($\pi = 0.107$ et $\pi = 0.034$, respectivement). L'ensemble des séquences ont cependant pu être aisément alignées. Les arbres construits séparément à partir des séquences nucléotidiques de l'intron, de l'exon et des acides-aminés de PAL étant totalement congruents, l'analyse cladistique a donc été réalisée sur l'ensemble des fragments génomiques de PAL séquencés. Aucune accession de la banque de données GenBank n'a pu être ajoutée étant donné la nouveauté de ce marqueur pour le genre *Vanilla*.

Comme dans les deux précédents arbres, on retrouve les 3 grands clades α , β et γ bien supportés (PP=1, figure 9) sauf pour le clade γ (PP=0.9). Le clade ancestral α contient les trois accessions de *V. mexicana* qui présentent 100% d'identités nucléotidiques sur la séquence.

Dans le groupe β on retrouve les 4 clades $\beta 1$ à $\beta 4$ soutenus et structurés comme dans les analyses précédentes. Dans le clade (PP=1) qui diverge là encore des trois autres, la sous-division *V. palmarum* et *V. lindmaniana* est fortement supportée (PP=1).

L'espèce non identifiée (CR0100) absente des analyses précédentes se positionne de manière intermédiaire (PP=1) entre le clade $\beta 1$ et le groupe (PP=0.91) des clades $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$. Le clade $\beta 2$ est bien soutenu (PP=1) et regroupe les accessions de *V. cribbiana*. Le clade $\beta 3$ est également robuste (PP=1). On trouve à l'intérieur une première accession qui diverge correspondant à l'espèce *V. chamissonis*, puis le groupe des *V. pompona* (PP=0.95) au sein duquel existe un sous-groupe hétérogène formé d'une *V. pompona* introduite à Madagascar (CR1529), des hybrides mexicains (*pompona* x *planifolia*, *planifolia* x *pompona*) et de manière très surprenante, de l'hybride *bahiana* x *lindmaniana*).

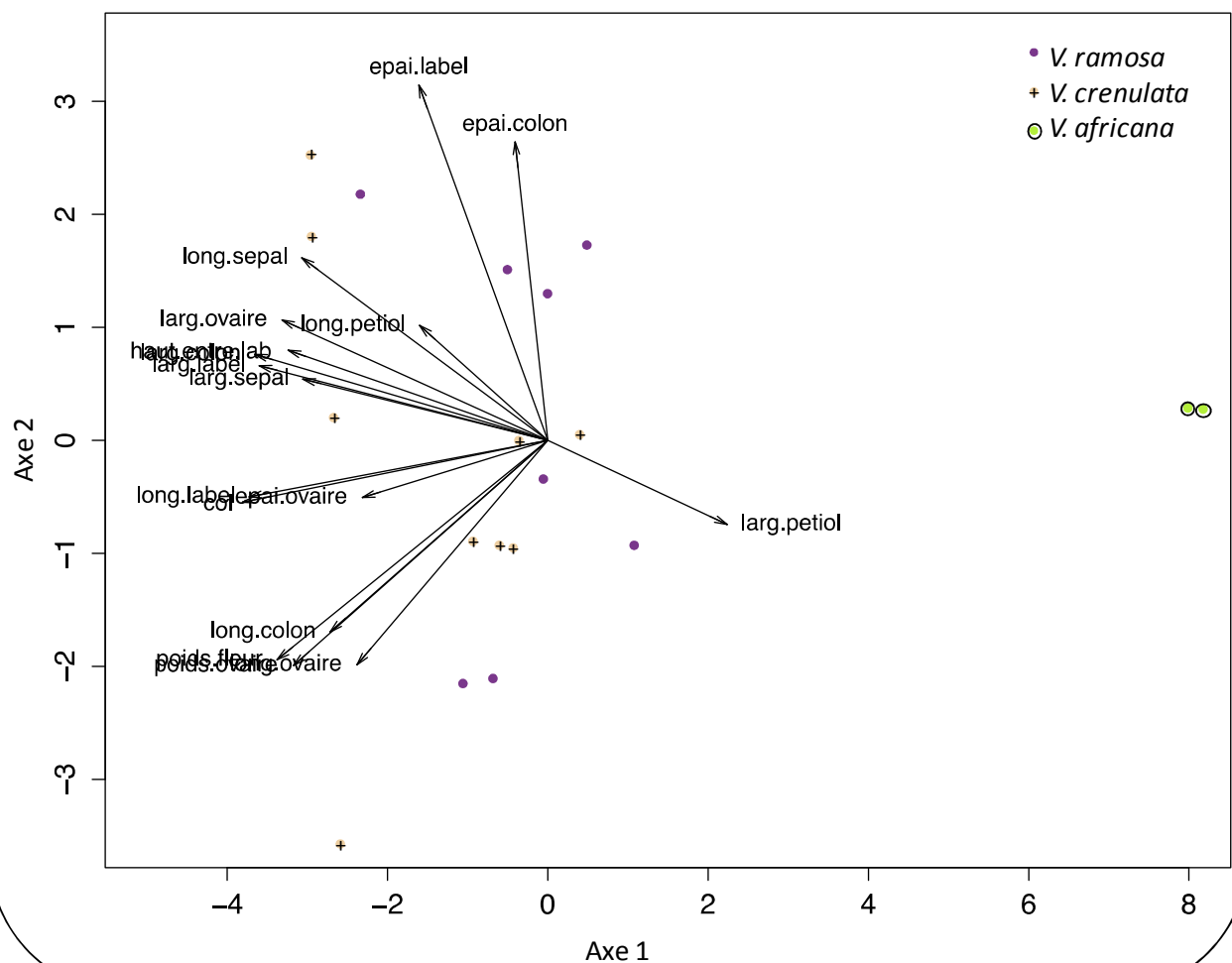


Figure 10 : Biplot de l'ACP obtenue sur les trois espèces de vanilles africaines *V. africana*, *V. ramosa* et *V. crenulata*. L'axe 1 représente 53.36% de la variance, l'axe 2 représente 14.51% de la variance.

Le clade $\beta 4$ est composé d'un clade bien supporté (PP=1) où l'on trouve les accessions de *V. odorata*, *V. insignis* et une espèce non identifiée (CR0117) mais apparentée à *V. odorata*. Contrairement à l'arbre obtenu avec les séquences ITS, les accessions de *V. xtahitensis* sont disjointes de ce groupe *odorata-insignis* et forment pour PAL un groupe spécifique (PP=1) au sein du groupe *V. planifolia* (PP=0.99). Les séquences des accessions de *V. planifolia* et de ses hybrides sont assez hétérogènes, faisant apparaître plusieurs sous-clades : un sous-clade contient les accessions de *V. bahiana* ainsi que 4 espèces non identifiées (CR1522, CR1524, CR1525, CR1526) apparentées à *V. bahiana* ou *V. phaeantha*. Comme chez les deux arbres précédents, le clade $\gamma 1$ des vanilliers asiatiques (PP=1) est le premier à diverger (PP=0.9). Le clade $\gamma 4$ (PP=1) diverge ensuite (PP=0.93), les deux accessions de *V. africana* s'individualisent nettement (PP=1) par rapport à celles de *V. ramosa* et *V. crenulata* (PP=1). Les autres clades séparent bien les accessions de *V. françoisii* ($\gamma 2$), celles de *V. dilloniana* ($\gamma 5$, PP=1), celles de *V. imperialis* ($\gamma 3$, PP=1) des aphylls de l'Océan indien ($\gamma 5$, PP=0.92). Dans ce dernier groupe les espèces aphylls à fleurs jaunes, *V. humblotii*, *V. perrieri* et deux espèces non identifiées (CR1683 et CR1682) supposées être *V. perrieri*, se distinguent des autres ($\gamma 6$, PP=1).

Comparaisons morphologiques des accessions du groupe de *V. africana*

Parmi les accessions de vanilliers dont les traits morphologiques ont été mesurés, nous choisissons de présenter le cas des espèces *V. africana*, *V. ramosa* et *V. crenulata*, proches phylogénétiquement, *V. africana* divergeant avant le clade non résolu *V. ramosa-V. crenulata* (figures 6 à 8).

L'ACP permet de distinguer nettement deux groupes : l'un comprend les fleurs des deux accessions de *V. africana* et l'autre rassemble les fleurs des accessions de *V. crenulata* et *V. ramosa* (figure 10). Les variables différenciant le plus les accessions sur l'axe 1 sont : le poids total de la fleur, la largeur et l'épaisseur du labelle et l'épaisseur de la colonne. Sur l'axe 2 se sont la hauteur de l'entrée du labelle, la largeur du rostellum, la longueur et la largeur de l'ovaire. La MANOVA non paramétrique indique une différence des traits floraux entre les trois espèces ($F=1089$, $R^2=0.57$, $p\text{-value}=0.0007^{***}$). Le test *post hoc* indique des différences significatives entre *V. africana* et les deux autres espèces ($p\text{-value}=0.0152^*$ et 0.0236^*) mais pas entre *V. ramosa* et *V. crenulata* ($p\text{-value}=0.061$).

Conformément aux données phylogénétiques, les espèces *V. crenulata* et *V. ramosa* sont morphologiquement indiscernables l'une de l'autre mais bien distinctes de *V. africana*.

Discussion

Résoudre la phylogénie du genre *Vanilla* et sa centaine d'espèces est un travail complexe. Depuis Rolfe (1895) puis Portères (1954) et leurs classifications basées sur les caractères morphologiques, jusqu'à l'avènement des techniques de biologie moléculaire et les nouvelles phylogénies proposées par Cameron (2005, 2011), Bouetard *et al.*, (2010), Soto Arenas & Cribb (2010), la systématique du genre a fortement évolué. Cette étude apporte un éclairage nouveau sur les relations phylogénétiques entre les différentes espèces du genre *Vanilla* grâce au génotypage de nouveaux taxons et à l'emploi de nouveaux marqueurs moléculaires.

Toutes les reconstructions phylogénétiques, quelque soit la méthode employée (NJ, ML ou Bayésienne) ou le marqueur utilisé (gènes chloroplastiques, *psaB+psbC+matK*, ITS, fragment de gène PAL), convergent sur différents points. Tout d'abord, elles confirment la structuration du genre en trois grands clades, nommés respectivement groupe α , β et γ , par Bouetard *et al.* (2010). Cette étude va donc dans le sens la révision du genre *Vanilla* proposée par M. Soto Arenas (Soto Arenas & Cribb, 2010 ; Soto Arenas & Dressler, 2010). Dans ce système, le sous genre *Vanilla* correspond au groupe α , et le sous genre *Xanata* qui rassemble les groupes β et γ est divisé en deux sous-sections, *Xanata* pour le groupe β et *Tethya* pour le groupe γ . Notre étude qui met en jeu une diversité de marqueurs (chloroplastiques et nucléaires, régions codantes ou non-codantes) et inclut un jeu de taxon représentatif de la diversité des vanilliers du globe, confirme la robustesse de cette nouvelle classification infragénérique du genre qui invalide l'ancienne classification de Portères.

En complément des marqueurs moléculaires déjà utilisés dans les phylogénies du genre *Vanilla* dans les précédentes études, nous avons durant ce stage développé de nouveaux marqueurs en recherchant les parties introniques de gènes très conservés dans le Règne Végétal afin de tenter d'améliorer la division taxonomique des groupes mal résolus. Ce travail a abouti à la définition de plusieurs couples d'amorces permettant l'amplification de marqueurs nucléaires sur deux gènes impliqués dans le métabolisme des phenylpropanoïdes. Le marqueur PAL (comprenant une région non codante encadrée par deux régions codantes) a permis d'obtenir des arbres phylogénétiques tout aussi résolutifs au niveau interspécifique que le marqueur ITS qui fait référence. Selon Kress & Erickson (2008), les conditions d'un « code-barre » idéal pour l'identification de taxons sont d'avoir une séquence relativement courte et d'être amplifiable avec des amorces fonctionnant sur l'ensemble des taxons. Ce nouveau marqueur (~780nt), amplifiable sur la centaine d'accessions du genre *Vanilla* de

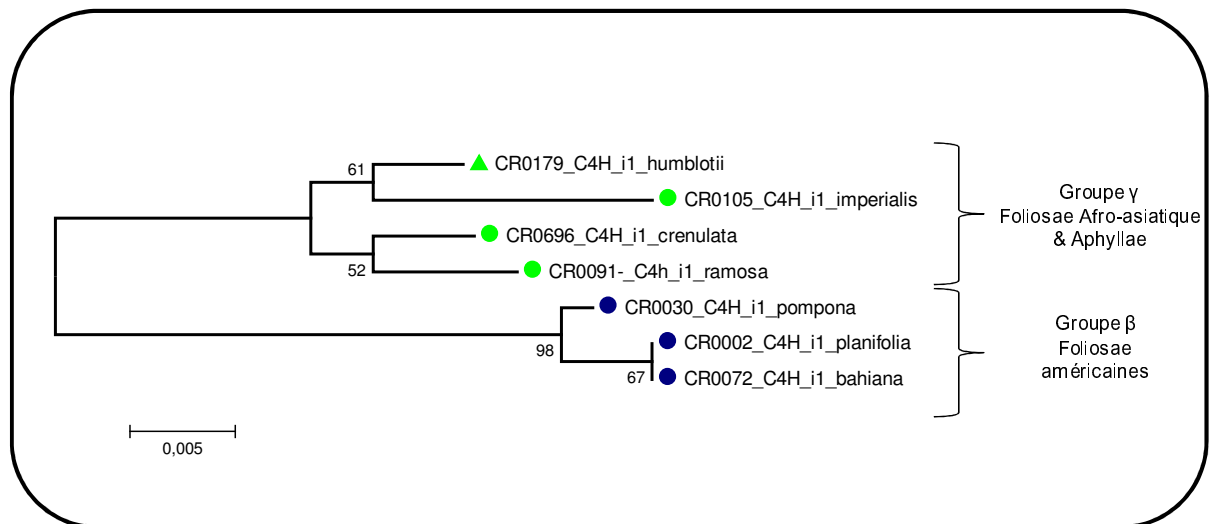


Figure 11: Phylogramme de l'intron 1 du gène C4H obtenu avec la technique du Neighbor-Joining. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées au niveau des nœuds des branches. Les caractères « aphyllé »(▲) et « folié »(●) sont précisés ainsi que l'origine géographique (bleu pour l'Amérique, vert pour l'Afrique)

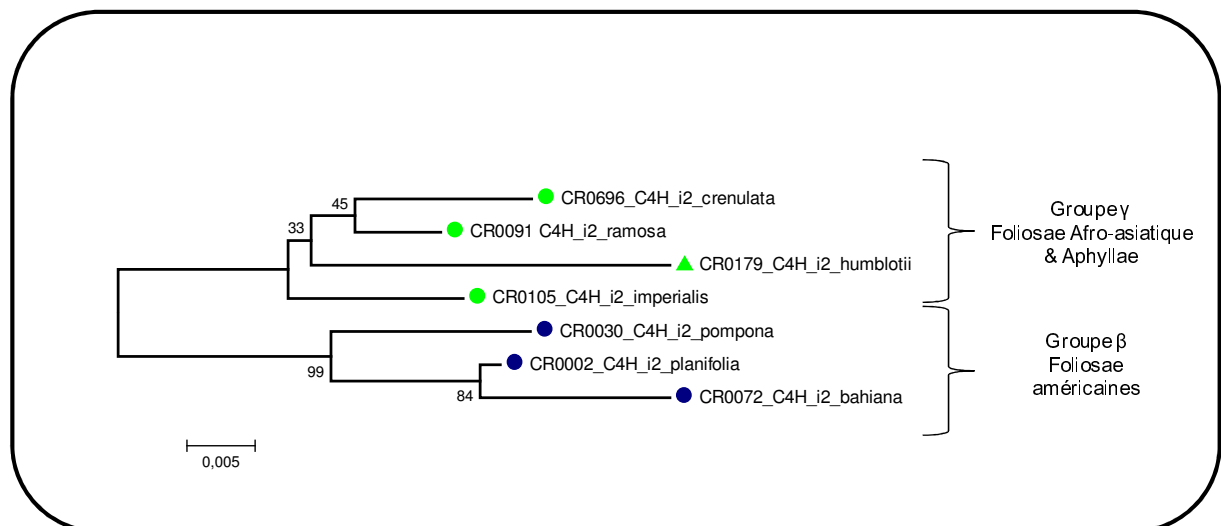


Figure 12: Phylogramme de l'intron 2 du gène C4H obtenu avec la technique du Neighbor-Joining. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées au niveau des nœuds des branches. Les caractères « aphyllé »(▲) et « folié »(●) sont précisés ainsi que l'origine géographique (bleu pour l'Amérique, vert pour l'Afrique)

cette étude, pourrait être utilisé en tant que « code-barre ». Cependant, le gène PAL fait partie d'une famille souvent multigénique, qui, à la différence de la région ITS, n'est pas conservée par un mécanisme d'évolution concertée (Alvarez & Mendel, 2003), ce qui peut induire des biais en cas d'amplification de fragments paralogues. Le fort polymorphisme des accessions des espèces du clade β 4 (à l'exception de *V. bahiana*), par rapport aux autres clades, pourrait traduire ce phénomène. Ce marqueur en est donc au stade expérimental, mais mériterait d'être testé sur d'autres espèces de vanilliers voire sur d'autres espèces de la famille des Orchidaceae.

Des amorces ont également été conçues pour amplifier deux introns putatifs du gène C4H dont un seul a été confirmé sur la base de la taille des produits amplifiés. L'analyse des séquences obtenues pour les deux fragments par la méthode du Neighbor Joining sur sept accessions de vanilliers (Figure 11 et 12) permet malgré leur petite taille de nettement différencier les espèces entre elles et particulièrement les groupes β et γ . Ces premiers résultats, permettent d'envisager de développer cette stratégie en étudiant le potentiel d'autres gènes candidats pour lesquels des séquences de *Vanilla planifolia* sont disponibles, tels que 4HBS, CAD, COMT, F3'5'H, F3'H, F3H, CHS, CHI, CCR, CAMT et ANS.

Les analyses phylogénétiques réalisées dans cette étude ont permis d'éclairer aussi les relations entre différentes espèces. Portères (1954), faisait état de sept espèces aphylls différentes dans la zone Océan Indien, constituant le « groupe mascarenhasien ». Ce groupe était peu résolu par les analyses moléculaires antérieures (Gigant, 2008). Dans cette étude, nous avons étudié 23 accessions d'espèces aphylls de l'Océan Indien, supposées couvrir assez largement la diversité du groupe (au moins cinq des sept espèces) compte tenu de leurs origines géographiques et de leurs caractères morphologiques. Les arbres obtenus avec les différents marqueurs, placent l'ensemble des accessions dans seulement trois clades : l'un composé des espèces de vanilliers à fleurs jaunes (*V. humblotii* et *V. cf. perrieri*), un second composé des espèces apparentées à *V. roscheri* (accessions originaires de Madagascar, Zanzibar et Afrique du Sud) et un troisième composé d'individu récemment échantillonnés dans le Nord Est de Madagascar nettement disjoint des deux autres. Ces derniers résultats suggèrent de possibles synonymies au sein du clade des espèces aphylls de l'Océan Indien.

Bon nombre d'accessions encore mal identifiées dans la collection de vanilliers du CRB Vatel ont pu être mieux caractérisées. Les approches couplées du "barcoding" et de l'analyse morphologique des traits floraux ont en particulier permis d'élucider la position des accessions

du clade $\gamma 4$. Ce groupe composé des espèces *V. africana*, *V. crenulata* et *V. ramosa* (selon Soto & Cribb, 2010), forme bien un clade à part entière sur les différents arbres phylogénétiques de cette étude. Cependant d'après nos données, les individus attribués à *V. ramosa* et *V. crenulata*, s'ils diffèrent bien de ceux de l'espèce *V. africana*, sont indiscernables entre eux que ce soit avec les données phylogénétiques ou avec les analyses statistiques portant sur les traits floraux. Ces accessions se distinguent néanmoins par la taille des feuilles et des fruits. Trois hypothèses peuvent être posées : (1) l'identification d'un des deux types d'accessions est erronée, (2) il y a une synonymie entre les espèces *V. crenulata* et *V. ramosa*, (3) l'une des deux accessions est un hybride (les hybridations interspécifiques naturelles ont déjà été décrites dans le genre). L'examen des descriptions morphologiques de ces espèces (Portères, 1954) incline plutôt à reconsidérer ces accessions comme apparentées à *V. crenulata*.

Soto Arenas & Cribb (2010), considèrent que *V. lindmaniana* serait un synonyme de *V. palmarum*. Cependant, d'après nos analyses phylogénétiques, les deux accessions de *V. lindmaniana* s'individualisent nettement de celle de *V. palmarum* pour tous les marqueurs employés. D'autre part les accessions attribuées à ces espèces présentent des différences sensibles de morphologie des fruits. Sous réserve de vérification des échantillons d'herbiers, cela suggère que *V. lindmaniana* serait bien une espèce distincte de *V. palmarum*.

Les arbres phylogénétiques (sur PAL et ITS) ont permis d'observer le regroupement de certains vanilliers non identifiés avec certains clades. C'est notamment le cas des accessions CR1522, CR1524, CR1525 et CR1526 toutes regroupées dans le clade soutenu des *V. bahiana* laissant supposer des espèces telles que *V. bahiana* ou des espèces proches telle que *V. phaeantha* qui a été introduite à Madagascar où ces accessions sont actuellement conservées.

Cette étude apporte d'une part des compléments aux phylogénies obtenues jusqu'alors sur le genre *Vanilla* mais également un aspect de méthodologie avec la conception et le test de nouveaux marqueurs qui pourront être utilisés dans la reconstruction phylogénétique du genre *Vanilla* ainsi que dans l'amélioration de l'outil qu'est le "barcoding" permettant l'identification d'espèces.

Conclusion

Les vanilliers constituent un genre emblématique et ancestral de la grande et ancienne famille des Orchidacées. La systématique du genre a été récemment invalidée et sa révision taxonomique est en cours. Les travaux de caractérisation moléculaire des vanilliers entrepris dans le cadre de ce stage ont fourni un ensemble de données très important tant par les nombres d'espèces et d'accessions étudiées (103 accessions appartenant à 25 espèces putatives) que par le nombre et la diversité des marqueurs utilisés (4 marqueurs chloroplastiques et 2 marqueurs nucléaires) : 424 971 nucléotides identifiés et vérifiés au total ! L'analyse de ces données, bien qu'encore partielle (certains jeux de données mériteraient d'être explorés davantage ou combinés entre eux), apporte des éléments à la fois méthodologiques (choix des marqueurs les plus appropriés) et phylogénétiques éclairant pour l'étude systématique du genre *Vanilla*. Par rapport aux marqueurs moléculaires précédemment employés chez les vanilliers le couple d'amorce encadrant l'intron 1 du gène PAL que nous avons développé, s'avère être une alternative intéressante au fragment ITS souvent utilisé en barcoding, puisqu'il est fonctionnel sur tous les taxons du genre, simple à mettre en œuvre (1 séquence de 780 nt) et tout aussi résolutif. Toutes nos analyses phylogénétiques concourent à valider la division infra générique du genre *Vanilla* proposée par Soto Arenas & Cribb (2010) en 2 sous genres, *Vanilla* et *Xanata*, le second étant subdivisé en deux sections (*Xanata* et *Tethya*). Un regard particulier a été porté sur le groupe des vanilliers aphyllés du Sud Ouest de l'Océan indien. Nos analyses portant sur 23 accessions de ce groupe, morphologiquement et géographiquement diverses, identifient seulement trois clades (*V. rosheri*, *V. humblotii* et *V. cf. madagascariensis*) et suggèrent donc qu'il existe probablement des synonymies au sein des sept espèces actuellement recensées. Enfin, l'identification taxonomique de plusieurs accessions du CRB Vatel a pu être précisée, invalidée ou confirmée à la lumière des nouvelles données moléculaires et des données morphologiques des appareils végétatifs et reproducteurs (notamment pour les espèces *V. ramosa*, *V. crenulata*, *V. palmarum*, *V. lindmanian* et *V. françoisii*).

Ces résultats, précieux pour finaliser la révision taxonomique du genre et la compréhension de l'histoire évolutive du genre *Vanilla*, devront être complétés par la prise en compte de davantage de taxons (en particulier asiatiques) et surtout être confrontés aux approches basées sur les données cytogénétiques et de génétique des populations.

Bibliographie

Ah-Peng, F. and Payet, I. 2010. Taxonomie et évolution du complexe d'espèces *Vanilla pompon* (Orchidaceae). Stage de master 1, Université de la Réunion

Baldwin, B. G. Sanderson, M. J. Porter, J. M. Wojciechowski, M. F. Campbell, C. S. Donoghue, M. J. 1995. The its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82(2): 247-277

Belanger, F.C and Havkin-Frankel, D. 2011. Molecular analysis of a Vanilla Hybrid Cultivated in Costa Rica. *Handbook of Vanilla Science and technology*. 15: 256-265

Bory, S. Grisoni, M. Duval, M. F. and Besse, P. 2007. Biodiversity and preservation of Vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55: 551-571

Bory, S. Catrice, O. Brown, S. Leitch, I .J Gigant, R. Chiroleu, F. Grisoni, M. Duval, M-F. and Besse, P. 2008. Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Genome*. 51: 816-826

Bouetard, A. Lefeuvre, P. Gigant, R. Bory, S. Pignal, M. Besse, P. Grisoni, M. 2010. Evidence of transoceanic dispersion of the genus Vanilla based on plastid DNA phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55: 621-630

Bouriquet, G. 1954. Le vanillier et la vanille dans le monde. *Encyclopédie biologique XLVI*. Lechevalier, Paris VI

Cameron, K. M. 2000. Gondwanan biogeography of Vanilloideae (Orchidaceae). In 3rd Southern Connection Congress, Programmes and Abstracts. 25-26. Lincoln University, Canterbury, New Zealand, 17-22 january 2000

Cameron, K.M. 2003. Recent advances in the systematic biology of Vanilla and related orchids (Orchidaceae: subfamily Vanilloideae). First International Congress on the Future of the *Vanilla* Business, Princeton, NJ, USA

Cameron, K. M. 2004. Utility of plastid *psaB* gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31(3): 1157-1180

Cameron, K. M. 2005. Recent Advances in the Systematic Biology of *Vanilla* and Related Orchids (Orchidaceae : subfamily Vanilloideae). In First International Congress. 89-93, Princeton, NJ, USA

Cameron, K. M. 2009. On the value of nuclear and mitochondrial gene sequences for reconstructing the phylogeny of vanilloid orchids (Vanilloideae, Orchidaceae). *Annals of Botany*. 104(3): 377-385

Cameron, K. M. 2011. Vanilla Orchids, Natural History and Cultivation. Timber Press, USA

Cameron, K. M. and Chase, M. W. 1999. Phylogenetic relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern north American-eastern Asia phylogeographic disjunction. *Journal of Plant Research*. 112: 317-329

Cameron, K. M. and Chase, M. W. Whitten, W. M. Kores, P. J. Jarrell, D. C. Albert, V. A. Yukawa, T. Hills, H. G. and Goldman, D. H. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany*. 86: 208-224

Cameron, K. M. and Molina, M. C. 2006. Photosystem II gene sequences of *psbB* and *psbC* clarify the phylogenetic position of *Vanilla* (Vanilloideae, Orchidaceae). *Cladistics*. 22: 239-248

Chase, M. W. Salamin, N. Wilkinson, M. Dunwell, J. M. Kesanakurthi, R. P. Haidar, N. and Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 360: 1889-1895

Cowan, R. S. Chase, M. W. Kress, W. J. and Savolainen, V. 2006. 300,000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants. *Taxon*. 55(3): 611-616

D'Hont, A. Denoeud, F. Aury, J-M, Baurens, F-C Carreel, F. Garsmeur, O. Noel, B. Bocs, S. Droc, G. Rouard, M. Da Silva, C. Jabbari, K. Cardi, C. Poulain, J. Souquet, M. Labadie, K. Jourda, C. Lengelle, J. Rodier-Goud, M. Alberti, A. Bernard, M. Correa, M. Ayyampalayam, S. Mckain, M.R. Leebens-Mack, J. Burgess, D. Freeling, M. Mbéguié-A-Mbéguié, D. Chabannes, M. Wicker, T. Panaud, O. Barbosa, J. Hribova, E. Heslop-Harrison, P. Habas, R. Rivallan, R. François, P. Poiron, C. Kilian, A. Burthia, D. Jenny, C. Bakry, F. Brown, S. Guignon, V. Kema, G. Dita, M. Waalwijk, C. Joseph, S. Dievert, A. Jaillon, O. Leclercq, J. Argout, X. Lyons, E. Almeida, A. Jeridi, M. Dolezel, J. Roux, N. Risterucci, A-M. Weissenbach, J. Ruiz, M. Glaszmann, J-C. Quétier, F. Yahiaoui, N. Wincker, P. 2012. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*.

Demesure, B. Sodzi, N. and Petit, R. J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*. 4: 129-131

Dequaire, J. 1976. L'amélioration du vanillier à Madagascar. *Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée*. 23 :140-158

Dressler, R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. *Dioscorides Press*, Portland, Oregon

Duval, M-F. Bory, S. Andrzejewski, S. Grisoni, M. Besse, P. Causse, S. Charon, C. Dron, M. Odoux, E. and Wong, M. 2006. Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire. *Les Actes du BRG*. 6 :181-196

Felsenstein, J. 1985. Confidence-limits on phylogenies – an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791

Gigant, R. Bory, S. Grisoni, and Besse, P. 2011. Biodiversity and Evolution in the Vanilla Genus. (eds) Grillo, O. and Venora, G. The Dynamical Processes Of Biodiversity; Case studies of Evolution and Spatial Distribution. Intech, Rijeka, Croatia, p 366

Gigant, R. De Bruyn, A. Guiot, V. Viscardi, G. Gigord, L. Gauvin-Bialecki, A. Paillet, T. Humeau, L. Grisoni, M. Besse, P. 2012. Reproductive strategies and their consequences on fine-scale spatial genetic structure and diversity of the indigenous and endangered leafless *Vanilla humblotii* (Orchidaceae) from Mayotte (Comoros Archipelago, Indian Ocean). *Submitted to Annals of Botany*

Govaerts, R. Campacci, M. A. Holland Baptista, D. Cribb, P. George, A. Kreuz, K. and Wood, J. 2006. World Checklist of Orchidaceae

Grisoni, M. Besse, P. Bory, S. Duval, M-F. and Kahane, R. 2007. Towards an international plant collection to maintain and characterize the endangered genetic resources of *Vanilla*. *Acta Horticultura*

Guindon, S. and Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704

Hall, T. A. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98

Holder, M. and Lewis, P. O. 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature*. 4: 275-284

Hollingsworth, M. L. Laura, A. Forrest, L. Richardson, J. Pennington, R. T. Long, D.G. Cowan, R. Chase, M. W. Gaudeul, G. and Hollingsworth, P.M. 2009. DNA BARCODING: Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources*. 9: 439-457

Householder, E. Janovec, J. Balarezo Mozambique, A. Huinga Maceda, J. Wells, J. Valega, R. 2010. Diversity, natural history, and conservation of *Vanilla* (Orchidaceae) in amazoniana wetlands of Madre De Dios, Peru. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*. 4(1): 227-243

Huelsenbeck, J. P. and Bollback, J. P. 2001. Empirical and hierarchical Bayesian estimation of ancestral states. *Systematic Biology*, 50: 351-366

Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. 2001. MrBayes: bayesian inference of phylogenetics trees. *Bioinformatics Applications Note*. 17: 754-755

Khew, G. S and Chia, T. F. 2011. Parentage determination of *Vanda Miss Joaquim* (Orchidaceae) through two chloroplast genes *rbcL* and *matK*. *AoB PLANTS*

- Kress, W. J. Erickson, D. L.** 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *Plos One*. 2(6): 1-10
- Kress, W. J. and David Erickson, L.** 2008. DNA Barcoding: a Windfall for Tropical Biology? *Biotropica*. 40(4):405-408
- Kress, W. J. Wurdack, K. J. Zimmer, E. A. Weigt, L. A. and Janzen, D. H.** 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS*. 102: 8369-8374
- Kumar, S. Tamura, K. and Nei, M.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5: 150-163.
- Lauri, E.** 2012. Identification des espèces sauvages du genre *Vanilla* présentes dans la forêt protégée d'Ambodiriana à Madagascar. Stage de Master 1 , Université de la Réunion
- Lepers-Andrzejewski, S. Causse, M. Caromel, B. Wong, M. Dron, M.** 2011. Diversity and dynamics of the Tahitian *Vanilla* (*Vanilla xtahitensis*, Orchidaceae) genome: cytogenetic approaches. *American Journal of botany*. 38(6): 986-997
- Li, J. H. Liu, Z. J. Salazar, G. A. Bernhardt, P. Perner, H. Tomohisa, Y. Jin, X. H. Chung, S. W. and Luo, Y. B.** 2011. Molecular phylogeny of *Cypripedium* (Orchidaceae: Cypripedioideae) inferred from multiple nuclear and chloroplast regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61(2): 308-320
- Loeillet, D.** 2003. Le marché international de la vanille. *FruitTrop*. 98: 4-7
- Lubinsky, P. Van Dam, M. and Van Dam, A.** 2006. Pollination of *Vanilla* and evolution in Orchidaceae. *Orchids*. 75: 926-929
- Lubinsky, P. Cameron, K. M. Molina, M. K. Wong, M. Lepers-Andrzejewsky, S. Gomez-Pompa, A. Kim, S. C.** 2008. Neotropical roots of a Polynesian spice: the hybrid origin of Tahitian *Vanilla*, *Vanilla tahitensis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*. 95(8): 1-8
- Micheneau, C.** 2002. Relations phylogénétiques des Neottieae (Orchidaceae) et étude de la variabilité génétique de *Cephalanthera longifolia* à l'aide de marqueurs moléculaires (séquençage et microsatellites chloroplastiques). Laboratoire d'Ecologie Terrestre, pp.40. Université Paul Sabatier, Toulouse
- Minoo, D. Nirmal Babu, K. Ravindran, P. N. and Peter, K. V.** 2006. Interspecific hybridization in *Vanilla* and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*. 108: 414-422
- Newmaster, S.G. Faekas, A.J. and Ragupathy, S.** 2006. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigen tiered approach. *Canadian Journal of Botany*. 84 : 335-341

Nielsen, R. L. Siegismund, H. R. 1999. Interspecific differentiation and hybridization in *Vanilla* species (Orchidaceae). *Heredity* 83(5): 560-567

Pansarin, E. R. Salatino, A. Salatino, M. L. F. 2008. Phylogeny of South American Pogonieae (Orchidaceae, Vanilloideae) based on sequences of nuclear ribosomal (ITS) and chloroplast (*psaB*, *rbcL*, *rps16*, *trnL-F*) DNA, with emphasis on *Cleistes* and discussion of biogeographic implications. *Organisms, Diversity & Evolution*. 8: 171-181

Perrier, X. and Jacquemoud-Collet, J. P. 2006. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/>

Portères, R. 1954. Le genre *Vanilla* et ses espèces. Le vanillier et la vanille dans le monde (ed. P. Lechevalier) 94-290, Paris

Posada, D. and Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818

Rolfe, R.A. 1896. A revision of the genus *Vanilla*. *Journal of the Linnean Society* 32: 439-478

Roux-Cuvelier, M. and Grisoni, M. 2010. Conservation and Movement of *Vanilla* Germplasm. in: *Vanilla*. (eds) Odoux, E. and Grisoni, M. CRC Press, Taylor and Francis Group

Rozen, S. and Skaletsky, H. J. 2000. PRIMER3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds. S. Krawetz and S. Misener), pp.365-386.

Rubinoﬀ, D. Cameron, S. and Will, K. 2006. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? *TRENDS in Ecology and Evolution*. 21(1): 1-2

Shoemaker, J. S. Painter, I. S. and Weir, B. S. 1999. Bayesian statistics in genetics - a guide for the uninitiated. *Trends in Genetics*, 15: 354-358

Soto Arenas, M. A. 1999. Conservation of the genetic resources of *Vanilla*. *Journal of Canadian Orchids Congress*. UNAM University, Mexico

Soto Arenas, M. A. 2003. *Vanilla*. In: Pridgeon, A.M. Cribb, P.J. Chase, M.W. Rasmussen, F.N. eds. *Genera Orchidacearum: Orchidoideae*. Vol. 3. USA: Oxford University Press, 321-334

Soto Arenas, M. A. and Cribb, P. 2010. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. Ex Mil. (Orchidaceae: Vanilineae). *Lankesteriana*. 9(3): 355-398.

Soto Arenas, M. A. and Dressler, R. L. 2010. A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* Plumier ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*. 9(3): 285-354

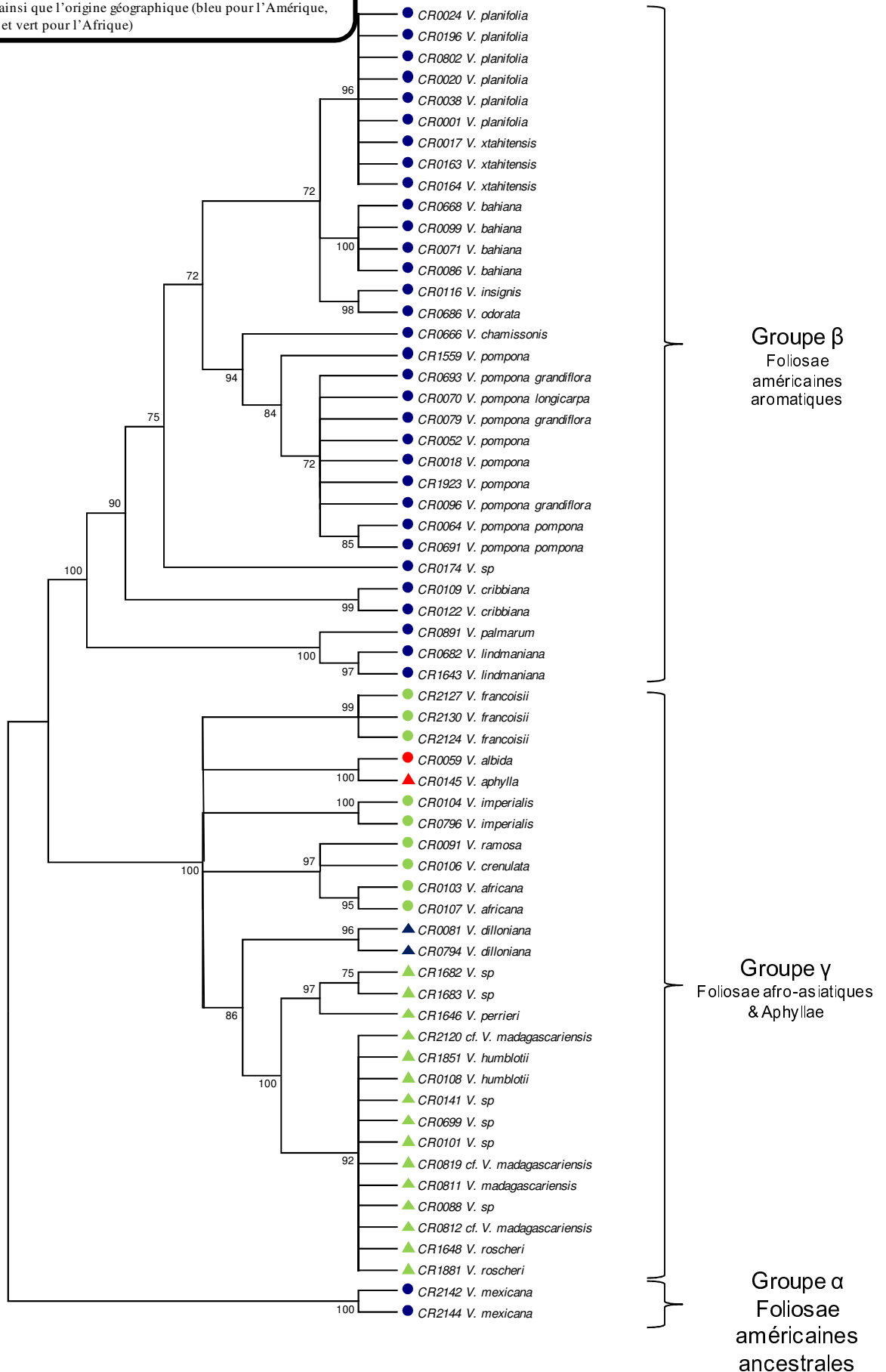
Thompson, J. D. Higgins, D. G. Gibson, T. J. 1994. Clustal-W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680

Annexes

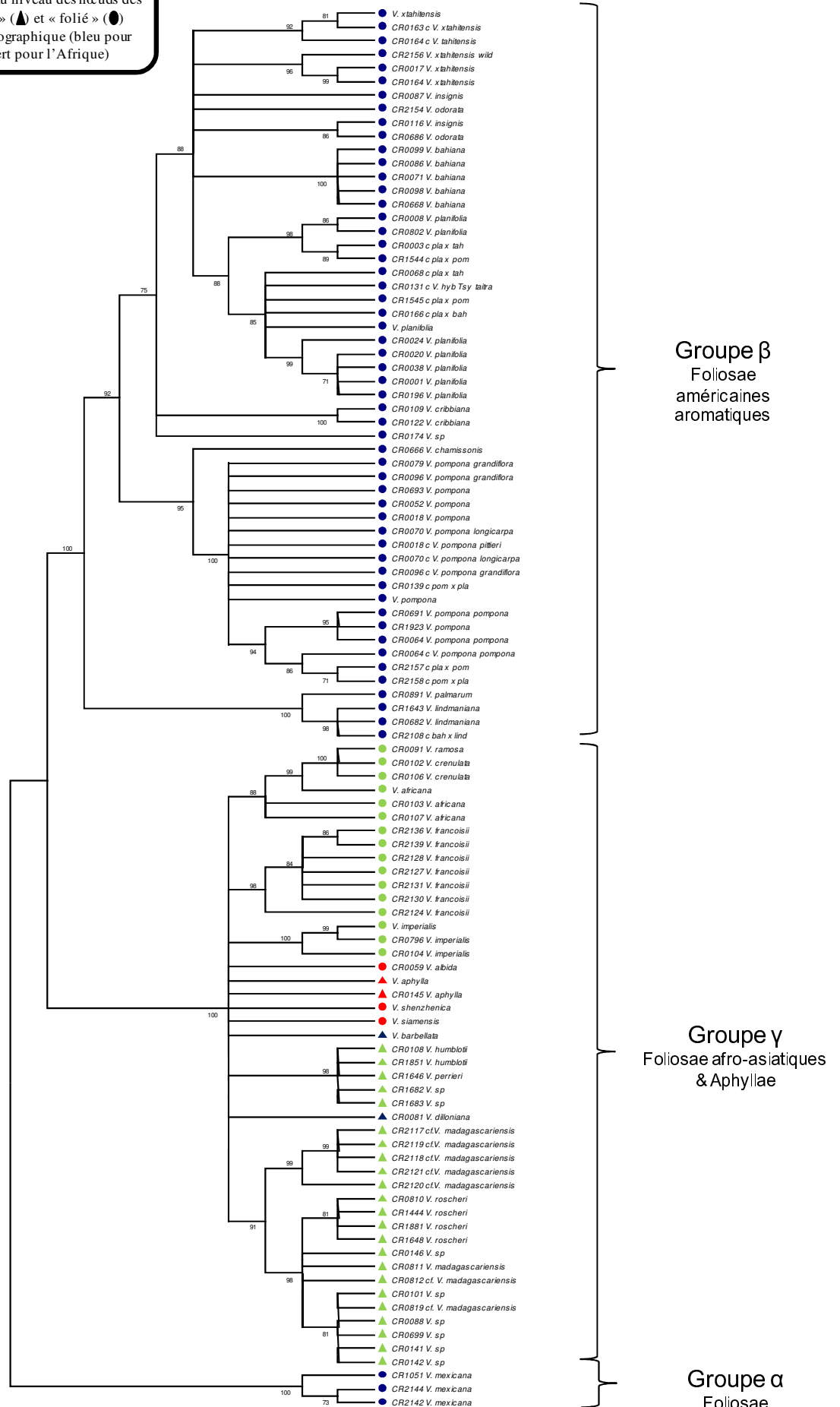
Couple d'amorces	Séquence 5' > 3'	Long.amorces (pb)	TM (°C)	Long.fragment (pb)
Locus PAL				
PAL232-21Fd/	AGCTGAAGATATCGCAGGTSG	21	59	712
PAL744-19R1	TGATGGTCCCTCGGGTAGG	19	59	
PAL222-20F/	GAGGGGGTGAAGCTGAAGAT	20	59	712
PAL776-20R	GTAGGACAGAGGGACGAGGT	20	59	
PAL222-20F/	GAGGGGGTGAAGCTGAAGAT	20	59	712
PAL776-20Rd	GTAGGASAGIGGGAYGAGGT	20	59	
PAL232-21Fd/	AGCTGAAGATATCGCAGGTSG	21	59	712
PAL744-19R2	TGATGGTGCCGCGGAGAGG	19	59	
PAL232-21Fd/	AGCTGAAGATATCGCAGGTSG	21	59	712
PAL744-19Rd	TGATGGTCCCTCGGGTRS	19	59	
PAL149-19F/	GGAGTTGCAGGGSAGYCA	19	59	712
PAL725-19R	CAGGCAAGGCGTGATGTTG	19	59	
PAL149-19Rd/	GGAGTTGCAGGGSAGYCA	19	59	712
PAL725-19Rd	CAGGCAAGGGGTGATITYK	19	59	
PAL149-19Rd/	GGAGTTGCAGGGSAGYCA	19	59	712
PAL725-19R	CAGGCAAGGCGTGATGTTG	19	59	
Locus C4H				
C4H1i1-716F/	TTAGGATCTGCAAGGAGGTCA	21	55	320
C4Hci1-951Rd	CGTTWATCTCGCCCTTCYTC	20	55	
C4H2i2-903F/	TGCGCAATAGATCACATTCTG	21	55	1195
C4H2i2-1298R	CCGGCTCTGTAATCTGAACG	20	55	
C4H1i2-910F/	CCATCGATCACATCCTTGAT	20	55	1195
C4H1i2-1278R	ATTCCAAGAACCACGTCCAG	20	55	
C4Hci2-897Fd/	CTSAGRTGCGCIATIGATCA	20	55	1195
C4Hci2-1272R	AGAACKKSGTCSAGCTCCT	20	55	
C4H1i1-716F/	TTAGGATCTGCAAGGAGGTCA	20	55	320
C4Hci1-937Rd	CTCGTTWATCTCGCCCTTCY	20	55	
C4Hci1-716Fd/	TTARGATCTGCAARGAGGTSA	21	55	320
C4Hci1-937Rd	CTCGTTWATCTCGCCCTTCY	20	55	
C4Hci1-716Fd/	TTARGATCTGCAARGAGGTSA	20	55	320
C4Hci1-951Rd	CGTTWATCTCGCCCTTCYTC	20	55	
C4H2i1-704F/	GGGGCTACCTCAAGATCTGC	20	55	320
C4Hci1-937Rd	CTCGTTWATCTCGCCCTTCY	20	55	
C4H2i1-704F/	GGGGCTACCTCAAGATCTGC	20	55	320
C4Hci1-951Rd	CGTTWATCTCGCCCTTCYTC	20	55	

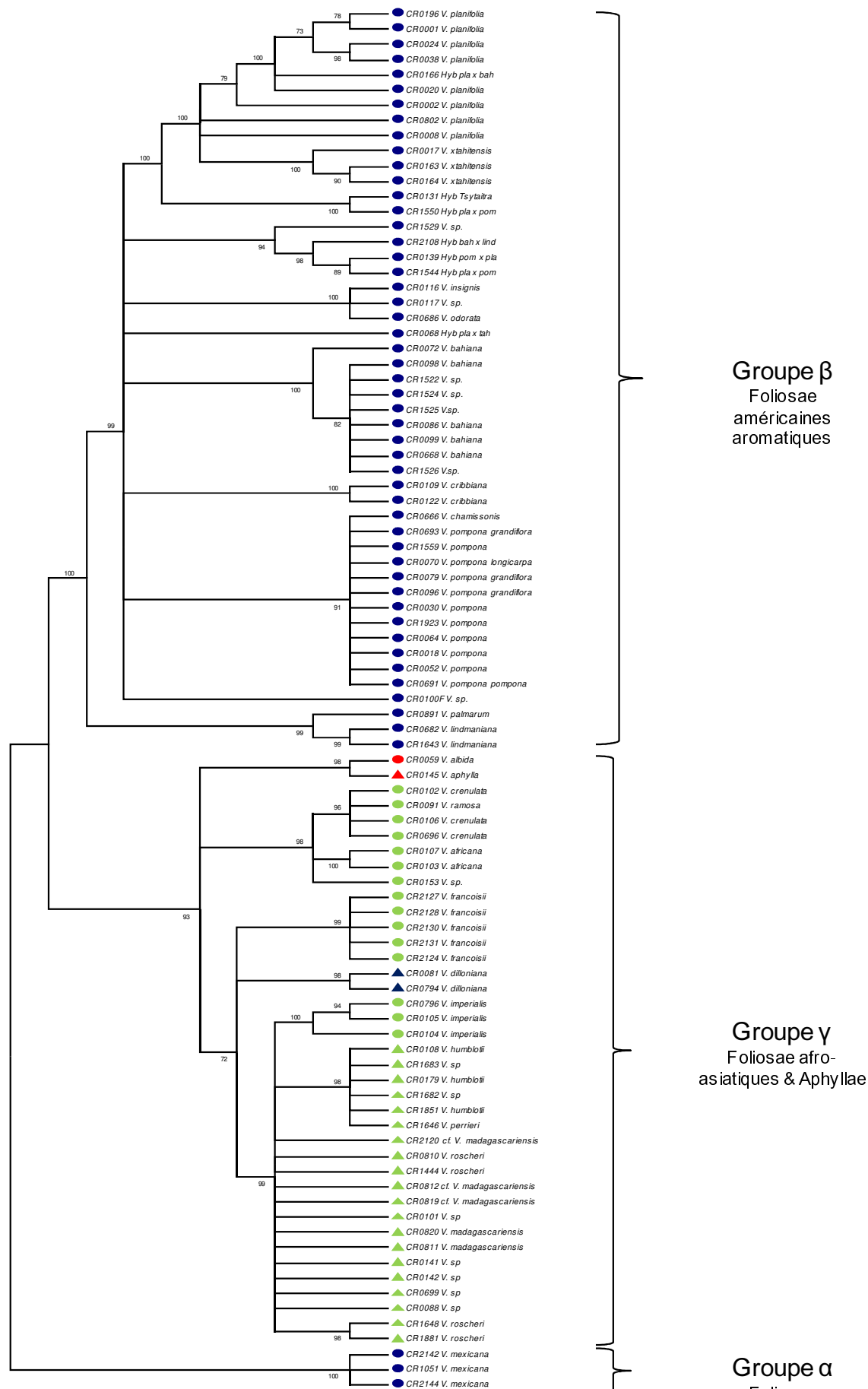
Annexe 1 : Tableau récapitulatif des amorces conçues pour les introns des gènes PAL et C4H. La longueur des amorces, la température d'hybridation et la taille du fragment amplifié sont indiqués

Annexe 2: Phylogramme des séquences concaténées des gènes chloroplastiques (*psaB*, *psbC*, et *matK*) obtenu par la méthode du Neighbor-Joining. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont indiquées au niveau des nœuds des branches. Les caractères « aphyllé » (▲) et « folié » (●) sont précisés ainsi que l'origine géographique (bleu pour l'Amérique, rouge pour l'Asie et vert pour l'Afrique)

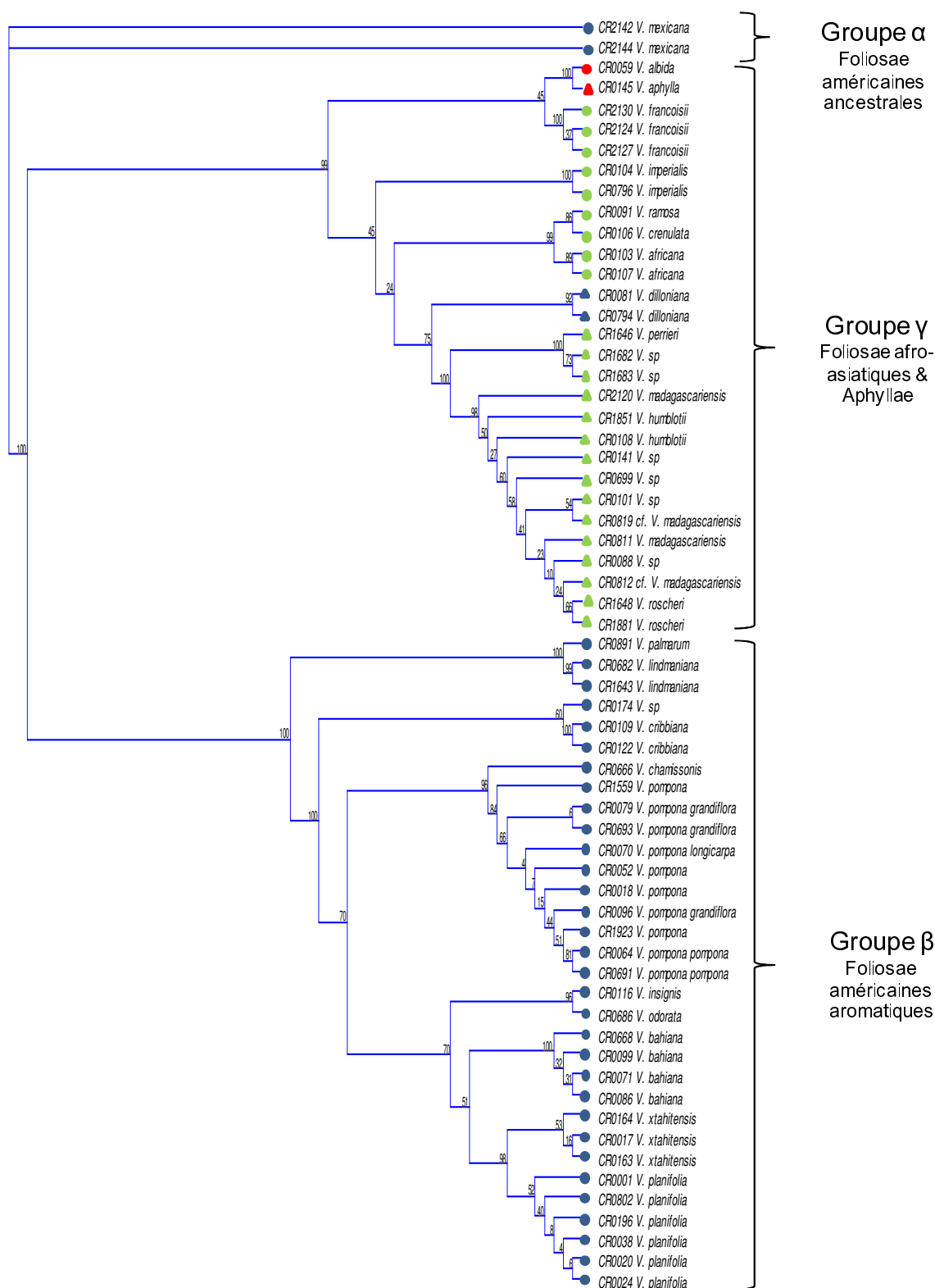


Annexe 2: Phylogramme de la région ITS obtenu par la méthode du Neighbor-Joining. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont indiquées au niveau des nœuds des branches. Les caractères « aphyllé » (▲) et « folié » (●) sont précisés ainsi que l'origine géographique (bleu pour l'Amérique, rouge pour l'Asie et vert pour l'Afrique)





Annexe 2: Phylogramme du gène PAL obtenu par la méthode du Neighbor-Joining. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont indiquées au niveau des nœuds des branches. Les caractères « aphyllé » (▲) et « folié » (●) sont précisés ainsi que l'origine géographique (bleu pour l'Amérique, rouge pour l'Asie et vert pour l'Afrique)



Annexe 3 : Phylogramme obtenu via la méthode du Maximum Likelihood à partir des séquences concaténées des gènes chloroplastiques (*psaB*, *psbC*, et *matK*). Les caractères « aphyll » (▲) et « folié » (●) sont précisés ainsi que l'origine géographique (Amérique en bleu, Asie en rouge et Afrique en vert). Les valeurs de bootstrap sont indiquées pour chaque nœud.

<i>Espèces</i>	Code GenBank
<i>V. pompona</i>	EU498164.1 (1)
<i>V. tahitensis</i>	AF391785.1 (2)
<i>V. siamensis</i>	JF825978.1 (3)
<i>V. shenzhenica</i>	JF796930.1 (3)
<i>V. aphylla</i>	AF151006.1 (2)
<i>V. barbellata</i>	FJ425835.1 (4)
<i>V. imperialis</i>	FJ425830.1 (4)
<i>V. africana</i>	FJ425834.1 (4)
<i>V. roscheri</i>	FJ425840.1 (4)
<i>V. planifolia</i>	AF391786.1 (2)

Annexe 4 : liste des séquences ITS issues de la banque de données GenBank. (1) Pansarin *et al.*, 2008 ; (2) Cameron and Chase, 1999 ; (3) Li *et al*, 2011 ; (4) Cameron, 2009

Résumé

Le genre *Vanilla* Plumier ex Miller est un genre emblématique et ancestral de la grande famille des Orchidaceae, pour lequel la diversité et l'histoire évolutive sont méconnues. Dans cette étude, nous avons génotypé une collection de 96 accessions de vanilliers représentative de la diversité mondiale en utilisant un ensemble de marqueurs moléculaires classiques (chloroplastique, *psaB*, *psbC*, *matK*, *trnH-psaB*, et nucléaire, espaceur intergénique de l'ADN ribosomiques (ITS)), ainsi que de nouveaux marqueurs développés à partir des séquences de deux gènes nucléaires candidats, PAL et C4H. Ces différents marqueurs aboutissent à des reconstructions phylogénétiques convergentes. Nos résultats valident ainsi les propositions récentes de révision de la taxonomie infra-générique des vanilliers, basés sur une subdivision du genre en trois clades. Ils permettent également de mieux renseigner l'identification taxonomique de certaines accessions en collection au CRB VATEL. Les outils de « barcoding » développés et évalués dans ce travail permettront de poursuivre plus efficacement la caractérisation de la diversité des vanilliers.

Mots-clés: *Vanilla*, Orchidaceae, Phylogénie, Barcoding, PAL, *matK*, ITS

Abstract

The genus *Vanilla* Plumier ex Miller is an ancient and emblematic genera of great family of Orchidaceae, which diversity and evolutionary history are poorly understood. In this study, we genotyped a collection of 96 accessions representative of the world diversity *Vanilla* species, using a set of standard molecular markers (plastid genes *psaB*, *psbC*, *matK*, *trnH-psbA* and nuclear intergenic spacer of ribosomal DNA (ITS)), as well as new markers developed from the sequences of two nuclear candidate genes, PAL and C4H. These markers resulted in converging phylogenetic reconstructions. Our results thus validate the recently proposed revision of the infrageneric taxonomy of *Vanilla*, based on a subdivision of the genus into three clades. They also contributed to better identify the accessions maintained in the BRC VATEL. The barcoding tools developed and evaluated in this work will help further characterizing the diversity of vanilla orchids.

Key-words: *Vanilla*, Orchidaceae, Phylogeny, Barcoding, PAL, *matK*, ITS